

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (Καθηγήτρια: Σαραφίδου Θεολογία)

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Γ' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ (Διευθυντής-Καθηγητής: Ν.
Παπαντωνίου)

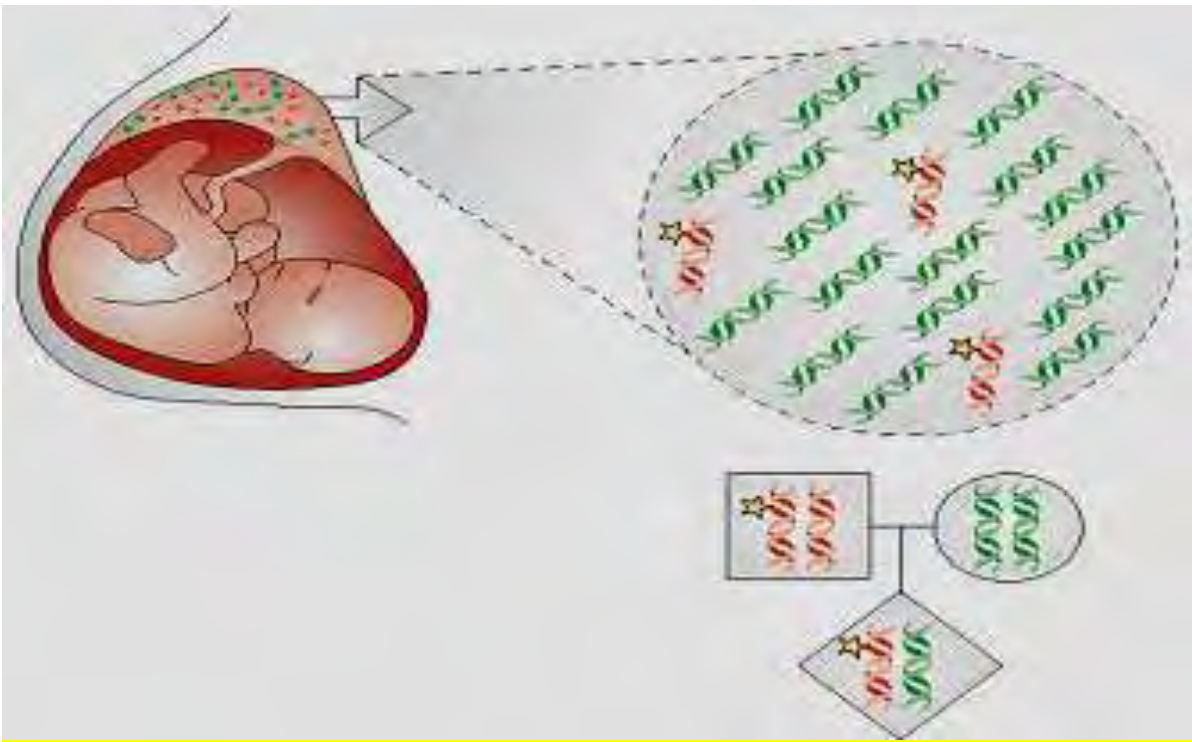
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ (Διευθύντρια –Καθηγήτρια: Σ. Κίτσιου-Τζέλη)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RhD
ΚΑΙ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΟ DNA ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
ΤΗΣ ΕΓΚΥΟΥ»

«NON-INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS FOR RHESUS D SYSTEM AND
SEX OF FETUS, USING CELL-FREE FETAL NUCLEIC ACIDS IN MATERNAL
PLASMA»

ΛΙΑΠΠΗ ΣΙΜΟΝΗ-ΜΑΡΙΝΑ



Αθήνα 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ✚ Παπαντωνίου Νικόλαος: Καθηγητής- Διευθυντής της Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών.

- ✚ Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- ✚ Κίτσιου –Τζέλη Σοφία: Καθηγήτρια- Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
3. ABSTRACT	7
4. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
4.1. ΕΛΕΥΘΕΡΟ DNA ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.	8
4.2. ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ DNA ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.	10
4.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ CF/DNA ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ: ΤΕΧΝΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ.	12
4.4. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	12
4.4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ CF/DNA ΑΠΟ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΕΓΚΥΟΥ.	13
4.4.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ CF/DNA ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ.	13
4.4.3. ΕΜΒΡΥΪΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	14
4.5. ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ CF/DNA ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΕΓΚΥΟΥ ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ.	16
4.5.1. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.	16
4.5.2. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΩΝ ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.	17
4.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.	19
4.7. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RHD ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.	21
4.8. ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.	22
4.9. ΠΡΟΛΗΨΗ.	24
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
5.1. ΣΚΟΠΟΣ	25
5.2. ΥΛΙΚΟ	26
5.3. ΜΕΘΟΔΟΙ	27
5.3.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	27
5.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ CF/DNA ΑΠΟ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΕΓΚΥΟΥ	28
5.3.2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	33
5.3.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ PCR	36
5.3.2.2. ΕΠΙΛΟΓΗ-ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ:	36
5.4. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΠΕΨΗ:	38
5.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ PCR	40
5.6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	40
5.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RHD ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	41
5.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	43
5.9. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ ΠΡΟΣ ΑΠΟΦΥΓΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΕΩΝ	45
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RHD ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	49
6.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	49
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη με τίτλο «Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του συστήματος RhD και φύλου του εμβρύου, από ελεύθερο DNA του πλάσματος της εγκύου» πραγματοποιήθηκε στη Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική και το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Παναπιστημίου Αθηνών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στο Καθηγητή-Διευθυντή της Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής κ. Νικόλαο Παπαντωνίου που μου εμπιστεύθηκε το θέμα της μελέτης, μου έδωσε την δυνατότητα να την εκπονήσω και συνέβαλε στη συλλογή των δειγμάτων και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Σοφία Κίτσιου-Τζέλη Διευθύντρια του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να χρησιμοποιήσω τα όργανα και τους χώρους του εργαστηρίου για τις ανάγκες της ερευνητικής προσπάθειας αλλά και για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της μελέτης.

Την Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κα. Σαραφίδου Θεολογία ευχαριστώ ιδιαίτερα για την έγκρισή της να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική εργασία εκτός της σχολής, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την ουσιαστική συμβολή της στη συγγραφή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστημίου Αθηνών, την Δρ. κ. Αγγελική Κολιαλέξη για τον σχεδιασμό της μελέτης και την καθοδήγηση της κατα την διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής,

καθώς και τις κυρίες Γεωργία Τούντα (Βιολόγος PhD) και Αλεξάνδρα Λυκούδη (Υποψήφια Διδάκτωρ) για την εκπαίδευση μου στις τεχνικές που απαιτούσε η μελέτη και την αμέριστη υποστήριξή τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία για μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, του συστήματος RhD και του φύλου του εμβρύου, με χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) που απομονώνεται από το πλάσμα της εγκύου. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει την χρήση ενός επιγενετικού εμβρυϊκού δείκτη (*RASSF1A*) για την επιβεβαίωση της παρουσίας cffDNA στο υπό μελέτη δείγμα και την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που οφείλονται είτε σε χαμηλά επίπεδα cffDNA στο δείγμα στη χρήση μεθόδων με μικρή ευαισθησία ανίχνευσης. Είναι γνωστό ότι ο υποκινητής του γονιδίου *RASSF1A* είναι μεθυλιωμένος στο πλακούντα και μη μεθυλιωμένος στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Χρήση μιας ευαίσθητης στη μεθυλίωση ενδονουκλεάσης, απομακρύνει τις μητρικής προέλευσης μη μεθυλιωμένες αλληλουχία του *RASSF1A*, αφήνοντας ανέπαφες τις μεθυλιωμένες αλληλουχίες εμβρυϊκής προέλευσης.

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 7ml περιφερικού αίματος από 30 εγκύους κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, σε 18 από RhD-αρνητικές εγκύους με RhD θετικό σύντροφο έγινε προσδιορισμός του συστήματος RhD του εμβρύου και 12 από κυήσεις υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση φυλοσύνδετου νοσήματος ταυτοποιήθηκε το φύλο του εμβρύου.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει την απομόνωση του cfDNA με την χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit και ενζυμική πέψη του δείγματος με χρήση της ευαίσθητης στη μεθυλίωση ενδονουκλεάσης (AciI). Η μέθοδος του πολλαπλού PCR χρησιμοποιήθηκε για τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών *SRY* και *DYS14* του χρωμοσώματος Y για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου και την επιβεβαίωση παρουσίας cffDNA στο δείγμα σε κυήσεις με έμβρυο αγόρι. Ο προσδιορισμός του συστήματος RhD του εμβρύου έγινε με ανίχνευση των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου ενώ η αλληλουχία *RASSF1A* χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της παρουσίας cffDNA στο δείγμα ανεξάρτητα από το φύλο του εμβρύου. Για την επιβεβαίωση επιτυχούς ενζυμικής πέψης χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία *ACTB* η οποία είναι μη μεθυλιωμένη τόσο στον πλακούντα όσο και το περιφερικό αίμα.

Το σύστημα RhD του εμβρύου ταυτοποιήθηκε κατά τον πρώτο κύκλο αντιδράσεων σε 17/18 δείγματα. Το δείγμα που υποβλήθηκε σε ένα δεύτερο αντιδράσεων διαγνώστηκε ως RhD-θετικό. Συνολικά, ανιχνεύτηκαν 12 RhD-θετικά και 6 RhD-αρνητικά έμβρυα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνο με τον προσδιορισμό του RhD μετά τον τοκετό με ορολογικές μεθόδους. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου ήταν 100%.

Κατά τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου 12/12 έμβρυα (7 αγόρια και 5 κορίτσια) διαγνώστηκαν επιτυχώς με τον πρώτο κύκλο αντιδράσεων (100% ευαισθησία και ειδικότητα).

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη είναι γρήγορη, ακριβής και μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε μοριακό διαγνωστικό εργαστήριο. Δίνει τη δυνατότητα αξιόπιστης ανίχνευσης των αλληλουχιών-στόχων ενώ ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται η παρουσία cffDNA στο δείγμα για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

3. ABSTRACT

This study reports on the clinical application of protocol designed and validated for non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of RhD status and sex of fetus in the 1st trimester of pregnancy, using cell free fetal DNA (cffDNA) isolated from maternal plasma. The designed protocols involve use of an epigenetic fetal marker (*RASSF1A*) to verify the presence of cffDNA in the tested samples and avoid false negative results due to low levels of cffDNA, or use of a non sensitive enough assay. It is known that the promoter region of *RASSF1A* is hypermethylated in placenta but hypomethylated in maternal blood. Use of a methylation-sensitive endonuclease can digest maternal hypomethylated *RASSF1A* sequences, leaving intact for amplification sequences of placenta origin.

7ml of maternal blood were obtained from 30 pregnant women in the 1st trimester. 18 were RhD-negative and were tested for determination of the fetal RhD status and 12 were at risk of X-linked disorders.

cffDNA was extracted with a commercially available kit and enzymatically digested using a methylation sensitive endonuclease (AclI). Multiplex PCR was performed for the simultaneous amplification of target sequences (*SRY* and *DYS14* from chromosome Y for fetal sex determination and RhD exons 7 and 10 for RhD status

determination), along with *RASSF1A* and *ACTB* sequences. Amplification of these loci indicates fetal gender and/or fetal RhD status, confirms the presence of cffDNA and allows assessment of digestion efficiency.

Fetal RhD status: Conclusive results from the first set of reaction were obtained in 17/18 cases in total, 11 RhD+ and 6 RhD- fetuses were identified. In 17/18 cases, non-invasive prenatal RHD genotyping was concordant with that serologically determined at birth. A sample submitted to a second set of PCR were accurately diagnosed. Overall the sensitivity of the test was 100%, the specificity 98 with 2% false positives.

Fetal sex determination: Analysis revealed 7 male and 5 female fetuses.

This protocol is fast, cost effective and easily applied in molecular diagnostic laboratories. They allow reliable detection of targeted sequences and at the same time verify the presence of cffDNA, avoiding false negative results.

4. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. ΕΛΕΥΘΕΡΟ DNA ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.

Ο όρος ελεύθερο DNA πλάσματος (cell free DNA-cfDNA), αναφέρεται σε μόρια DNA, εκτός κυτταρικού πυρήνα, χωρίς φυσιολογική δομή, τα οποία ανιχνεύονται στο πλάσμα ή στον ορό, δηλαδή σε μη κυτταρικό κλάσμα περιφερικού αίματος.

Το cfDNA παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στο περιφερικό αίμα υγιών αλλά και ασθενών το 1948 από τους Mandel και Metais [1].

Οι μελέτες όμως που αποδεικνύουν την κλινική σημασία του cfDNA δημοσιεύτηκαν αρκετά χρόνια αργότερα. Το 1966 και το 1977 αναφέρθηκε η παρουσία cfDNA στον ορό ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και ρευματοειδή αρθρίτιδα αντίστοιχα . Το 1977, ο Leon και συν. διαπίστωσε αύξηση του cfDNA στον ορό ασθενών με καρκίνο παγκρέατος και στατιστικώς σημαντική μείωσή του μετά από αποτελεσματική θεραπεία [2].

Το 1994, σε δύο ανεξάρτητες μελέτες παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις ογκογονιδίων στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο . Η διαπίστωση αυτή δημιούργησε νέες προοπτικές για την ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων διάγνωσης και παρακολούθησης της πορείας διαφόρων τύπων νεοπλασμάτων. Η κλινική αξιοποίηση αυτού του δείκτη όμως δεν είχε πραγματοποιηθεί μέχρι το 1996 όταν δύο ερευνητικές ομάδες ανέφεραν ταυτόχρονα την παρουσία cfDNA πλάσματος ασθενών με καρκίνο των ίδιων ειδικών μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν και στο DNA του όγκου .

Το 1998 ο Mutirangura και συν. ανίχνευσε DNA του ιού Epstein-Barr (EBV) σε ασθενείς με καρκίνο του λάρυγγα με τη χρήση ποσοτικού PCR πραγματικού χρόνου (RTQ-PCR) . Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι τα επίπεδα cfDNA του EBV μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτης για την ανίχνευση ατόμων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του λάρυγγα.

Το 1997 ο Lo και συν. διαπίστωσε την παρουσία εξωκυτταρικού ελεύθερου DNA εμβρυικής προέλευσης (cell free fetal DNA-cffDNA) στον ορό και το πλάσμα εγκύων με ανίχνευση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος σε ποσοστό 80% των

εγκύων που κυοφορούσαν έμβρυο αγόρι [3]. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη νέων μεθόδων μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου[4,5,6,7,8].

4.2. ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ DNA ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.

Το cffDNA ανιχνεύεται στη μητρική κυκλοφορία πολύ νωρίς κατά την κύηση (έχει ανιχνευθεί ακόμη και την 18η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, σε περιστατικά υποβοηθούμενης αναπαραγωγής) και αποτελείται κυρίως από μικρά θραύσματα DNA, 80% των οποίων έχουν μέγεθος < 200bp .

Πρόσφατες μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική του ψηφιακού (digital) PCR, έδειξαν ότι η συγκέντρωση του cffDNA στη μητρική κυκλοφορία ανέρχεται σε ποσοστό ~10% του συνολικού cfDNA. Η απόλυτη συγκέντρωση cffDNA στη μητρική κυκλοφορία επηρεάζεται από το σωματικό βάρος της εγκύου και ποικίλει μεταξύ των εθνοτήτων . Αυξάνει σημαντικά με την πρόοδο της κύησης και κυμαίνεται από 16 γενετικά ισοδύναμα/ml περιφερικού αίματος το 1ο τρίμηνο έως 80 γενετικά ισοδύναμα/ml το 3ο τρίμηνο με εντυπωσιακή αύξηση μετά την 8η εβδομάδα .

Μεταβολές της συγκέντρωσης του cffDNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου έχουν παρατηρηθεί σε κυήσεις εμβρύων με αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων όπως στο σ. Down και σε επιπλοκές της κύησης, όπως η προεκλαμψία, ο πρόωρος τοκετός, ο επεκτατικός σχηματισμός του πλακούντα, η εμβryo-μητρική αιμορραγία και το πολυυδράμνιο. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί η χρησιμοποίηση του cffDNA ως δείκτη για την παρακολούθηση κυήσεων υψηλού κινδύνου και για την εμφάνιση επιπλοκών της κύησης σε χαμηλού κινδύνου ασυμπτωματικές εγκύους .

Η διαδικασία απελευθέρωσης cffDNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, φαίνεται όμως ότι η πιθανότερη πηγή προέλευσής του είναι ο πλακούντας και σε μικρό βαθμό τα εμβρυικά κύτταρα της μητρικής κυκλοφορία [2]. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τη διαπίστωση ύπαρξης άμεσης συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης του cffDNA και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης στο ίδιο δείγμα . Ο Wataganara και συν. μελέτησε τα επίπεδα του cffDNA στο πλάσμα γυναικών, μετά από ιατρογενή τερματισμό της κύησης κατά το 1ο τρίμηνο . cffDNA ανιχνεύθηκε ήδη από την 32η ημέρα μετά τη σύλληψη και η ποσότητά του παρουσίαζε αύξηση με την εξέλιξη της κύησης. Αντίθετα, έντεκα ημέρες μετά από διακοπή της κύησης ανιχνεύθηκε cffDNA μόνο σε 6/29 γυναίκες, πιθανώς λόγω ατελούς απομάκρυνσης του πλακούντα.

Η απομάκρυνση του cffDNA από τη μητρική κυκλοφορία γίνεται σχεδόν αμέσως μετά τον τοκετό. Ποσοτικός προσδιορισμός του cffDNA σε σειρά δειγμάτων γυναικών που κυοφορούσαν έμβρυο αγόρι σε διαφορετικούς χρόνους μετά τον τοκετό, έδειξε πλήρη απομάκρυνση των αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y δύο ώρες μετά τον τοκετό [2]. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του cffDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι περίπου 16.3 λεπτά. Η ανίχνευση επομένως του cffDNA είναι ειδική για κάθε κύηση και αποκλείεται κάθε πιθανότητα παραμονής του από προηγούμενη εγκυμοσύνη. Πιθανολογείται ότι σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση του cffDNA από την μητρική κυκλοφορία παίζουν οι νεφροί και το ήπαρ λόγω της διαταραχής που έχει παρατηρηθεί στην απομάκρυνση του cffDNA σε κυήσεις με προεκλαμψία [9].

4.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cfDNA ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ: ΤΕΧΝΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ.

Η δυσκολία πραγματοποίησης μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου από cfDNA που απομονώνεται από τη μητρική κυκλοφορία οφείλεται στη μικρή ποσότητα cfDNA στο πλάσμα της εγκύου, στο πολύ μικρό ποσοστό του cfDNA σε σχέση με το ολικό cfDNA μητρικό (1:20), και στις ομοιότητες που εμφανίζει το εμβρυϊκό με το μητρικό γενετικά υλικό αφού το έμβρυο κληρονομεί το μισό γενετικό υλικό από τη μητέρα[2].

4.4. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.

Το cfDNA μπορεί να απομονωθεί είτε από το πλάσμα ή τον ορό του περιφερικού αίματος της εγκύου, στις περισσότερες μελέτες όμως προτιμάται η χρησιμοποίηση πλάσματος επειδή το ποσοστό του μητρικού cfDNA στον ορό είναι 14.6 υψηλότερο συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος πιθανώς λόγω της απελευθέρωσής του από τα μητρικά κύτταρα κατά τη δημιουργία του θρόμβου .

Η λήψη του δείγματος γίνεται κυρίως με τη χρήση αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), που διατηρηθεί τη μορφολογία των κυττάρων του δείγματος και εμποδίζει τη λύση τους έως και 24 ώρες μετά την αιμοληψία .

4.4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ cfDNA ΑΠΟ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΕΓΚΥΟΥ.

Η απομόνωση του cfDNA γίνεται με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων kits, με χειροκίνητη διαδικασία ή με αυτόματα ρομποτικά συστήματα, τα οποία ελαττώνουν το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

4.4.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cfDNA ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ.

Η χαμηλή συγκέντρωση του cfDNA στο πλάσμα εγκύου, απαιτεί για την ανίχνευσή του, τη χρησιμοποίηση τεχνικών υψηλής ευαισθησίας για αυτό και το RTQ-PCR έχει υιοθετηθεί ως μέθοδος επιλογής από τα περισσότερα εργαστήρια που ασχολούνται με μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο [10].

Άλλες τεχνικές που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί είναι η φασματογραφία μάζας (mass spectrometry) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC - high performance liquid chromatography) .

Η τεχνολογία του ψηφιακού PCR (digital PCR), έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου και μονογονιδιακών νοσημάτων . Η τεχνική επιτρέπει την ακριβή μέτρηση του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου

Τα συστήματα αλληλούχησης νέας γενιάς (Massive Parallel Sequencing-MPS) χρησιμοποιούνται σήμερα επιτυχώς στην κλινική πράξη για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο των σημαντικότερων χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου.

4.4.3. ΕΜΒΡΥΪΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Το πιο σημαντικό ίσως πρόβλημα στη χρησιμοποίηση του cffDNA στο μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο είναι η έλλειψη ενός πολύ ειδικού δείκτη που να επιβεβαιώνει την παρουσία εμβρυϊκού υλικού στο υπό μελέτη δείγμα ώστε να αποφευχθούν αμφίβολα ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που οφείλονται είτε σε επίπεδα cffDNA μικρότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ή σε πλήρη έλλειψη εμβρυϊκού υλικού από το δείγμα .

Οι εμβρυϊκοί δείκτες πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν στη διαγνωστική διαδικασία και να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με τις υπό μελέτη αλληλουχίες ως θετικοί μάρτυρες (controls) για να ελεγχθεί η παρουσία του cffDNA.

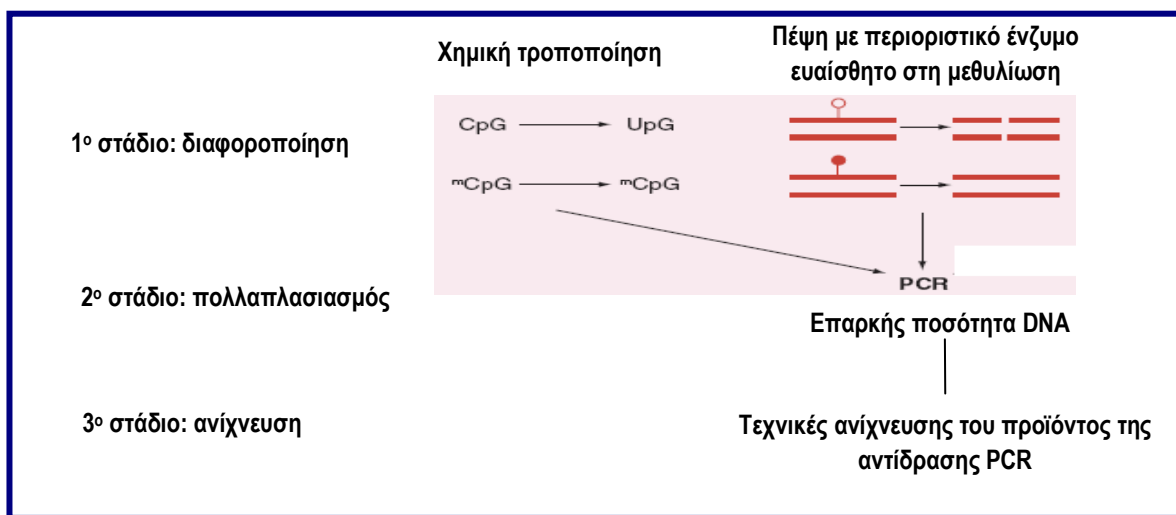
Για πολλά χρόνια αλληλουχίες του χρωμοσώματος Υ οι οποίες είναι προφανές ότι απουσιάζουν από το γονιδίωμα της μητέρας χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες παρουσίας εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα. Όμως ο δείκτης αυτός βρίσκει πρακτική εφαρμογή μόνο σε κυήσεις με έμβρυο αγόρι .

Πολυμορφισμοί πατρικής προέλευσης που απουσιάζουν από τη μητέρα μπορούν επίσης να αποτελέσουν εμβρυϊκούς δείκτες ανεξάρτητους από το φύλο του εμβρύου.

Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μιας βάσης (SNPs), σημειακές μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί τμημάτων του DNA όπως οι STR αλληλουχίες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την επιβεβαίωση της παρουσίας εμβρυϊκού υλικού στο υπό μελέτη δείγμα . Οι δείκτες αυτοί όμως δεν είναι πάντα πληροφοριακοί και η διαδικασία ανίχνευσής τους είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στις επιγενετικές διαφορές μεταξύ εμβρυϊκού και μητρικού DNA στο περιφερικό αίμα της

εγκύου. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, ακετυλίωση, κτλ.) προκαλούν αλλαγές στο φαινότυπο χωρίς όμως να μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA και μπορούν να ανιχνευθούν είτε μετά από χημική τροποποίηση κατά την οποία οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες παραμένουν άθικτες, είτε με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση τα οποία κόβουν και απομακρύνουν αποκλειστικά τις μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης μετά από χημική τροποποίηση ή πέψη με περιοριστικό ένζυμο ευαίσθητο στη μεθυλίωση.

Μελέτες έδειξαν ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *maspin* (*SERPINB5*) εκφράζεται αποκλειστικά στον πλακούντα και η έκφρασή του ρυθμίζεται από το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή [2]. Μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες του γονιδίου μπορούν να ανιχνευθούν μόνο στον πλακούντα και όχι στο περιφερικό αίμα της εγκύου [2]. Μετά από χημική τροποποίηση με δισουλφίδιο του νατρίου, ανίχνευση των

αλληλουχιών του γονιδίου *maspin* στο πλάσμα εγκύου το 3^ο τρίμηνο της κύησης έδειξε περίπου εξαπλάσια συγκέντρωση των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών του γονιδίου σε κυήσεις με προεκλαμψία σε σχέση με ομάδα ελέγχου και επιβεβαίωσε τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των επιγενετικών διαφορών ως δείκτη παρουσίας εμβρυικού υλικού στο πλάσμα της εγκύου ανεξάρτητα από το φύλο του εμβρύου ή γενετικούς πολυμορφισμούς [11].

Ένας δεύτερος επιγενετικός δείκτης, ο υποκινητής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RASSF1A, στη χρωμοσωμική θέση 3p21.31, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την επιβεβαίωση της παρουσίας cfDNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Ο υποκινητής του RASSF1A είναι μεθυλιωμένος στον πλακούντα και μη μεθυλιωμένος στα κύτταρα της μητέρας δηλαδή παρουσιάζει πρότυπο μεθυλίωσης αντίθετο από αυτό του γονιδίου *maspin*. Επιπλέον, η απομάκρυνση των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών RASSF1A μπορεί να γίνει με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου ευαίσθητου στη μεθυλίωση. Η μέθοδος αυτή υπερτερεί σαφώς της χημικής τροποποίησης η οποία έχει ενοχοποιηθεί για αποδόμηση του DNA έως και 96% .

4.5. ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ CFDNA ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΕΓΚΥΟΥ ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΈΛΕΓΧΟ.

4.5.1. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

Η ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στο πεδίο του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου.

Η χρήση των συστημάτων MPS έχει προσφέρει νέες δυνατότητες στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Τα συστήματα αυτά μπορούν να αναλύσουν την αλληλουχία εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA σε μία εφαρμογή, να ποσοτικοποιήσουν πολύ μικρές μεταβολές της αναλογίας των χρωμοσωμάτων και να ανιχνεύσουν έμβρυα με τρισωμία 21 με βάση την μεγαλύτερη ποσότητα αλληλουχιών του χρωμοσώματος 21 σε σύγκριση με την ποσότητά τους στο περιφερικό αίμα εγκύων που κυοφορούν έμβρυα χωρίς τη χρωμοσωμική ανωμαλία.

Η Fan και συν. αξιολόγησε τις δυνατότητες της μεθόδου σε cfDNA από κυήσεις 10–35 εβδομάδων και διέγνωσαν επιτυχώς έμβρυα με τρισωμία 21, 18 και 13 [2]. Η Chiu και συν. διαφοροποίησε τη μέθοδο προκειμένου να ανιχνεύσει ταυτόχρονα την τρισωμία 21 και διαφορές των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Με τη χρήση ενός αλγόριθμου έγινε υπολογισμός του ποσοστού συγκεκριμένων αλληλουχιών, ειδικών για το υπό μελέτη χρωμόσωμα και σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό στην ομάδα ελέγχου.

4.5.2. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΩΝ ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ.

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρονομούνται με επικρατητικό τρόπο, είναι εφικτή μόνο όταν η παθολογική

μετάλλαξη είναι πατρικής προέλευσης και πραγματοποιείται με ανίχνευση της μετάλλαξης στο πλάσμα της εγκύου. Το μέγεθος της μετάλλαξης αποτελεί περιορισμό, καθώς επεκτάσεις, εισδοχές και διπλασιασμοί μεγέθους >300bp δεν μπορούν να ανιχνευθούν λόγω του μικρού μεγέθους των θραυσμάτων του cffDNA [2].

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρονομούνται με υπολειπόμενο αυτοσωμικό τρόπο δεν είναι εφικτή όταν και οι δύο γονείς είναι φορείς της ίδια μετάλλαξης αφού δεν υπάρχει τρόπος να διαχωριστεί το μητρικό αλληλόμορφο από αυτό του εμβρύου. Το cffDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προγεννητικό έλεγχο μόνο όταν οι γονείς είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων και το έμβryo πιθανός διπλός ετεροζυγώτης. Στην περίπτωση αυτή η πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου όταν η πατρική μετάλλαξη δεν ανιχνευθεί και έτσι να ελαττωθεί ο αριθμός των κυήσεων που υποβάλλονται σε επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρονομούνται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο έχει πραγματοποιηθεί για την κυστική ίνωση, τη συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων και διάφορους τύπους αιμοσφαιρινοπαθειών .

Προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου μονογονιδιακών νοσημάτων και να μπορεί να εφαρμοστεί στις περιπτώσεις που οι γονείς φέρουν την ίδια μετάλλαξη, ο Lum και συν. ανέπτυξε μία μέθοδο βασισμένη στην τεχνική του ψηφιακού PCR η οποία ελέγχει την σχετική ποσότητα

της μετάλλαξης στο δείγμα . Στην περίπτωση που μία γυναίκα ετερόζυγη κυοφορεί έμβρυο ομόζυγο για το μεταλλαγμένο ή για το φυσιολογικό αλληλόμορφο, η ποσότητα στο πλάσμα της μεταλλαγμένων ή φυσιολογικών αλληλομόρφων αντίστοιχα θα είναι μεγαλύτερη, ενώ όταν το έμβρυο είναι ετερόζυγο οι ποσότητες των μεταλλαγμένων θα είναι ίση με των φυσιολογικών αλληλομόρφων. Όσον αφορά τη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση φυλοσύνδετων γενετικών νοσημάτων, αυτή περιορίζεται προς το παρόν στον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου από cffDNA που απομονώνεται από τη μητρική κυκλοφορία και μόνο όταν το φύλο του εμβρύου είναι αυτό στο οποίο εμφανίζεται το νόσημα η κύηση παραπέμπεται για προγεννητικό έλεγχο από βιοψία τροφοβλάστης για την ανίχνευση ή μη της παθολογικής μετάλλαξης [12].

4.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση του φύλου του εμβρύου ήταν η πρώτη κλινική εφαρμογή μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου από cffDNA και γίνεται με την ανίχνευση στο πλάσμα της εγκύου αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y [13].

Οι ενδείξεις μη επεμβατικού προσδιορισμού του φύλου του εμβρύου συμπίπτουν με τις ενδείξεις που έχουν καθοριστεί διεθνώς για την προγεννητική διάγνωση του φύλου. Σημαντικότερη ένδειξη αποτελεί το ιστορικό φυλοσύνδετων νοσημάτων στην οικογένεια. Είναι γνωστό ότι αγόρια που γεννιούνται από μητέρες που είναι φορείς φυλοσύνδετων νοσημάτων έχουν 50% κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο, ενώ τα κορίτσια, κατά κανόνα, δεν εκδηλώνουν την ασθένεια αλλά έχουν 50% πιθανότητα

να είναι φορείς όπως οι μητέρες τους. Στις περιπτώσεις αυτές, η μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του φύλου του εμβρύου νωρίς κατά τη κύηση και πριν τη βιοψία τροφοβλάστης (ηλικία κύησης < 11 εβδομάδες), έχει τη δυνατότητα να ελαττώσει κατά το ήμισυ σχεδόν τον αριθμό των επεμβατικών προγεννητικών ελέγχων περιορίζοντάς τους μόνο στις εγκύους που κυοφορούν έμβρυο αγόρι [14].

Άλλες ενδείξεις μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης του φύλου του εμβρύου περιλαμβάνουν υπερηχογραφική ανίχνευση ανωμαλιών των έξω γεννητικών οργάνων, ασυμφωνία του καρυοτύπου του εμβρύου με τα υπερηχογραφικά ευρήματα όσον αφορά το φύλο και υπερηχογραφικές ενδείξεις για την ύπαρξη γενετικού συνδρόμου που εκδηλώνεται κλινικά με αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα [2]. Στις περιπτώσεις αυτές, μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση του φύλου του εμβρύου μπορεί συμβάλλει στην διάγνωση, τη γενετική συμβουλευτική και τον καθορισμό της πρόγνωσης.

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του φύλου του εμβρύου έχει προταθεί και για την αντιμετώπιση ορισμένων ενδοκρινολογικών νοσημάτων, όπως η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων. Ασθενείς με συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων έχουν αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων[2]. Έκθεση σε αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων προγεννητικά, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων στα αγόρια, στα κορίτσια όμως προκαλεί πρόωμη αρρενοποίηση, ήδη από την 8η εβδομάδα της κύησης [15]. Οι κύησεις αυτές αντιμετωπίζονται προγεννητικά με χορήγηση δεξαμεθαζόνης στη μητέρα, που μπορεί να ελαττώσει ή/και να αναστείλει την αρρενοποίηση, αλλά προκαλεί πολλές παρενέργειες . Πρόωμη μη επεμβατική διάγνωση του φύλου του εμβρύου μπορεί να περιορίσει τη χορήγηση θεραπείας μόνο

σε εγκύους που κυοφορούν έμβρυο κορίτσι. Σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική, προτείνεται έναρξη της θεραπείας την 6η εβδομάδα, μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση του φύλου του εμβρύου την 7η εβδομάδα της κύησης και συνέχιση της θεραπείας μόνο όταν το έμβρυο είναι κορίτσι .

4.7. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RhD ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

Η δυνατότητα μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης του συστήματος RhD του εμβρύου, περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1998, σχεδόν ταυτόχρονα από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες στο Χονγκ Κονγκ και την Ολλανδία [4, 16]. Εφόσον το γονίδιο *RHD*, απουσιάζει πλήρως από το γονιδίωμα της πλειονότητας των RhD-αρνητικών γυναικών, ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου αυτού στο περιφερικό αίμα της εγκύου, υποδηλώνει ότι το έμβρυο είναι RhD-θετικό. Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος έχει αλλάξει ριζικά τον τρόπο αντιμετώπισης των RhD-αρνητικών εγκύων, ελαττώνοντας τη χορήγηση αντί-D μόνο στις εγκύους που κυοφορούν RhD-θετικό έμβρυο.

Στις περισσότερες μελέτες, η ανίχνευση του συστήματος RhD του εμβρύου γίνεται με RTQ-PCR και λόγω της ποικιλομορφίας του συστήματος RhD, στα περισσότερα εργαστήρια, ελέγχονται περισσότερα του ενός εξόνια [15, 17]. Η μελέτη περιλαμβάνει συνήθως εκκινήτες για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 7 του *RHD*, το οποίο διαφέρει σε αρκετές βάσεις από το *RHCE*, αυξάνοντας την ειδικότητα καθώς και την ευαισθησία της μεθόδου, αφού μπορεί να ανιχνεύσει εμβρυϊκές

αλληλουχίες από την 7η εβδομάδα της κύησης [18,19]. Με ταυτόχρονη χρήση εκκινητών για τα εξόνια 6 και/ή 4 και 5, μπορούν να προληφθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που οφείλονται στη παρουσία του μη λειτουργικού *RHD* ψ [20, 21]. Ποικιλομορφίες του γονιδίου *RHD* δεν είναι δυνατό να ανιχνευθούν. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα οφείλονται συνήθως σε επιμόλυνση του δείγματος ή συχνότερα στην ύπαρξη πολυμορφικού *RHD* αλληλομόρφου, ενώ τα ψευδώς αρνητικά στην αδυναμία ανίχνευσης cffDNA στο υπό μελέτη δείγμα. Προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που οφείλονται στην μικρή ποσότητα cffDNA στο δείγμα, συνίσταται επανάληψη λίγες εβδομάδες αργότερα ή χρησιμοποίηση ενός εμβρυϊκού δείκτη (π.χ. του *RASSF1A*) που να επιβεβαιώνει την παρουσία εμβρυϊκού υλικού.

4.8. ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

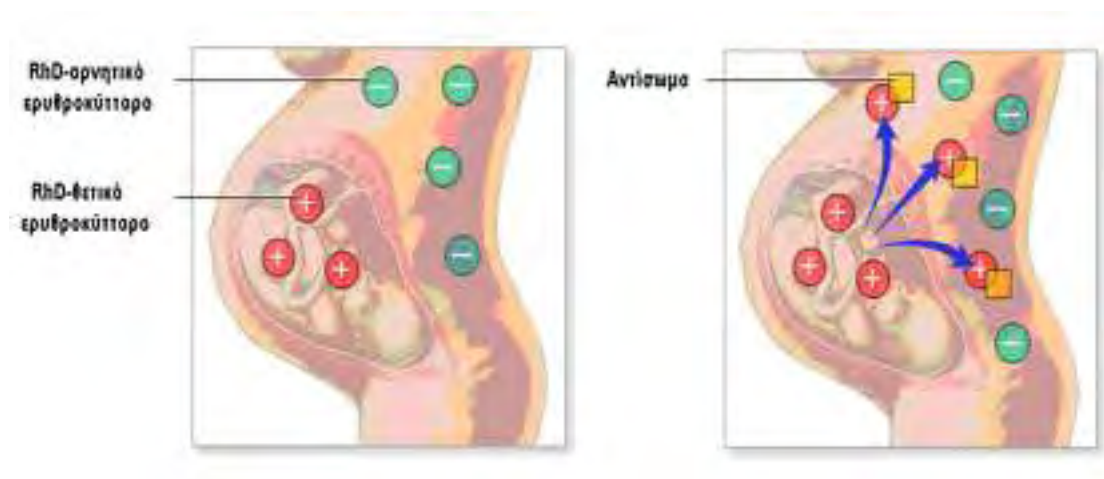
Οφείλεται σε μεταφορά στην εμβρυϊκή κυκλοφορία, μέσω του πλακούντα, ενεργών μητρικών αντισωμάτων έναντι αντιγόνων των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου, με αποτέλεσμα την ραγδαία καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Το σημαντικότερο αντιγόνο που σχετίζεται με τη νόσο είναι το RhD και δευτερευόντως οι παράγοντες του συστήματος ABO.

Αρχικά, παρατηρείται αύξηση των αντισωμάτων που ανιχνεύονται στο κλάσμα 19S της γ -σφαιρίνης (IgM) και αντικαθίστανται σταδιακά από το αντίσωμα 7S (IgG) [22].

Τα IgG αντισώματα διέρχονται μέσω του πλακούντα στην εμβρυϊκή κυκλοφορία με αποτέλεσμα την αιμολυτική νόσο του εμβρύου και του νεογνού.

Το έμβρυο αντιδρά στην αιμόλυση με εξωμυελική παραγωγή άωρων ερυθροβλαστών. Η εξωμυελική παραγωγή στο ήπαρ είναι δυνατό να προκαλέσει καταστροφή της αρχιτεκτονικής του, ελαττωμένη σύνθεση πρωτεϊνών, ασκίτη και πυλαία υπέρταση. Η βαριά αιμολυτική αναιμία προκαλεί υποξία στους ιστούς, μεταβολική οξέωση και υπερχολερυθριναιμία. Η τελευταία έχει νευροτοξική δράση, αλλά κατά την ενδομήτρια ζωή απομακρύνεται μέσω του πλακούντα και μεταβολίζεται στη μητρική κυκλοφορία. Στα τελικά στάδια εμφανίζεται γενικευμένο οίδημα με ασκίτη και καρδιακή ανεπάρκεια με περικαρδιακή συλλογή υγρού [23, 24].

Το νεογνό αντιμετωπίζει προβλήματα προωρότητας, βαρείας αιμολυτικής αναιμίας, υπερχολερυθριναιμίας και ηπατικής ανεπάρκειας. Το ήπαρ αδυνατεί να παράγει ικανοποιητικά επίπεδα της πρωτεΐνης-μεταφορέα της χολερυθρίνης και του ένζυμου γλυκουρονυλ-τρανσφεράσης που είναι απαραίτητα για την απομάκρυνση της χολερυθρίνης, με αποτέλεσμα πυρηνικό ίκτερο [25].



Εικόνα 2: Ευαισθητοποίηση RhD-αρνητικής εγκύου.

4.9. ΠΡΟΛΗΨΗ.

Η αιμολυτική νόσος του εμβρύου και του νεογνού αντιπροσωπεύει ένα από τα σημαντικότερα παραδείγματα επιτυχούς πρόληψης και διαχείρισης ασθένειας στην ιατρική. Γίνεται με πρόληψη της ευαισθητοποίησης των RhD-αρνητικών εγκύων με χορήγηση υπεράνοσης γ-σφαιρίνης (αντί-D).

Ζητήματα όμως που σχετίζονται με τη χρήση αντί-D δεν έχουν πλήρως επιλυθεί. Η αντί-D προέρχεται από ανθρώπινο ορό και παρά τους ενδεδειγμένους και ενδεδειγμένους ελέγχους, υπάρχει πάντα θεωρητικός κίνδυνος μετάδοσης σοβαρού νοσήματος [26, 27]. Επιπλέον πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι τα αποθέματα αντί-D παγκοσμίως δεν είναι απεριόριστα καθώς και η οικονομική επιβάρυνση που προκύπτει από τη χορήγησή της. Υπολογίζεται ότι 40% περίπου των RhD-αρνητικών εγκύων λαμβάνει άσκοπα ανοσοπροφύλαξη αφού κυοφορούν RhD-αρνητικό έμβρυο. Είναι συνεπώς προφανής η σημασία της γνώσης του συστήματος RhD του εμβρύου για τη σωστή διαχείριση της κύησης, τόσο για την ελάττωση του κόστους όσο και για την αποφυγή χορήγησης ανθρώπινης αντί-D στη μητέρα και στο έμβρυο.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης είναι ο μη επεμβατικός προσδιορισμός του φύλου και του συστήματος RhD του εμβρύου από cfDNA που απομονώνεται από το περιφερικό αίμα εγκύων με 1. οικογενειακό ιστορικό φυλοσύνδετων νοσημάτων και 2. RhD-αρνητικών εγκύων με RhD+ σύντροφο αντίστοιχα.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι η τεχνική πολλαπλού PCR, μετά από πέψη με ένζυμο ευαίσθητο στη μεθυλίωση για την απομάκρυνση των μητρικής προέλευσης μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A*.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές αντιδράσεις πολλαπλού PCR,

- 1) Η αντίδραση πολλαπλού PCR για τον προσδιορισμό του συστήματος RhD του εμβρύου περιλαμβάνει εκκινητές για τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό:
 - i. Αλληλουχιών των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου για καθορισμό του συστήματος RhD του εμβρύου
 - ii. Αλληλουχιών του γονιδίου *DYS14* για επιβεβαίωση της παρουσίας γενετικού υλικού του εμβρύου σε κυήσεις με έμβρυο αγόρι
 - iii. Αλληλουχίες του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A* για επιβεβαίωση της παρουσίας γενετικού υλικού του εμβρύου στο υπό μελέτη δείγμα (αφού έχει προηγηθεί ενζυμική πέψη για ανίχνευση μόνο των εμβρυϊκών αλληλουχιών, στο υπό μελέτη δείγμα) και

iv. Αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου *ACTB* για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενζυμικής πέψης.

2) Η αντίδραση πολλαπλού PCR για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου περιλαμβάνει εκκινητές για τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό:

- i. Αλληλουχιών των γονιδίων *SRY* και *TSPY* (αλληλουχία *DYS14*), που βρίσκονται στο χρωμόσωμα Y για καθορισμό του φύλου του εμβρύου
- ii. Αλληλουχίες του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A* για επιβεβαίωση της παρουσίας γενετικού υλικού του εμβρύου στο υπό μελέτη δείγμα (αφού έχει προηγηθεί ενζυμική πέψη για ανίχνευση μόνο του εμβρυϊκών αλληλουχιών, στο υπό μελέτη δείγμα) και
- iii. Αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου *ACTB* για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενζυμικής πέψης.

5.2. ΥΛΙΚΟ

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 30 δείγματα περιφερικού αίματος από εγκύους στο 1^ο τρίμηνο της κύησης, οι οποίες παρακολουθούνταν στο τμήμα Εμβρυομητρικής Ιατρικής της Α' και Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ.

Τα 18 δείγματα προέρχονταν από RhD-αρνητικές εγκύους με RhD-θετικό σύντροφο, και παραπέμφθηκαν για προγεννητικό προσδιορισμό του συστήματος RhD του εμβρύου, 10 ήταν αποθηκευμένα στο εργαστήριο (-80°C) και 8 προέρχονται από εγκύους που παραπέμφθηκαν για έλεγχο κατά τη διάρκεια της μελέτης.

12 δείγματα προέρχονται από εγκύους με οικογενειακό ιστορικό φυλοσύνδετων νοσημάτων, 8 από αυτά τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα στο εργαστήριο (-80°C) και 4 δείγματα στάλθηκαν για προγεννητικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της μελέτης.

(Πίνακας 1.)

Πίνακας 1.Γονίδια που μελετήθηκαν			
	Φύλο εμβρύου	RhD εμβρύου	
Αλληλουχίες	SRY & DYS14	Εξόνια 7 & 10 RHD	
Παρουσία cffDNA	RASSF1A	RASSF1A & SRY	
Επιτυχής ενζυμική πέψη	ACTB	ACTB	

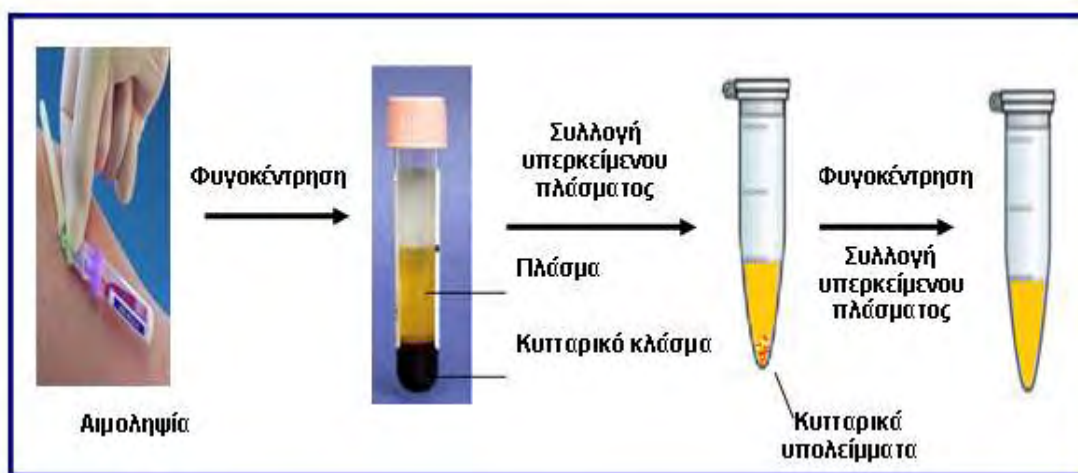
5.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη περιλαμβάνει 1) την απομόνωση του πλάσματος από περιφερικό αίμα εγκύου 2) την απομόνωση του cfDNA από το πλάσμα και 3) τη μελέτη των δειγμάτων με εφαρμογή της αντίδρασης πολλαπλού PCR στα δείγματα .

5.3.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Η απομόνωση cffDNA γίνεται από πλάσμα εγκύων, μετά από φυγοκέντρηση περιφερικού αίματος στις 2200 x g για 20min προκειμένου να αποφευχθεί η λύση των εμπύρηνων κυττάρων υπό την επίδραση μηχανικών δυνάμεων (Εικόνα 4). Ακολουθεί η μεταφορά του υπερκείμενου πλάσματος σε σωληνάριο 1.5ml τύπου

ependorff (RNase free, DNase free) με προσεχτικούς χειρισμούς ώστε να μην διαταραχθεί η στιβάδα των λεμφοκυττάρων και φυγοκέντρωση σε υψηλή ταχύτητα 14000 x g για 10min. Το υπερκείμενο διαμοιράζεται σε σωληνάρια τύπου eppendorff (~1ml/σωληνάριο) και αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης cfDNA.



Εικόνα 4: Σχηματικά η μεθοδολογία απομόνωσης πλάσματος από το περιφερικό αίμα εγκύου.

5.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ cfDNA ΑΠΟ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΕΓΚΥΟΥ

Η απομόνωση cfDNA γίνεται με τη χρήση του συστήματος απομόνωσης DNA QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen Inc., Germany) σε συσκευή κενού (Εικόνα 5A). Η διαδικασία που ακολουθείται αναφέρεται παρακάτω (Εικόνα 5B):

- i. Το πλάσμα ανασύρεται από τους -80°C και παραμένει στους 4°C για περίπου 30min.

- ii. 1ml πλάσματος επωάζονται για 30min στους 56°C με 800μl διαλύματος λύσης (Lysis Buffer ACL) και 100μl πρωτεϊνάσης K (Qiagen proteinase-K, δραστικότητα 600mAU/ml) για τον κατακερματισμό των πρωτεϊνών του πλάσματος, των πρωτεϊνικών τμημάτων των αποπτωτικών σωματίων και των πυρηνοσωματίων. Η πρωτεϊνάση K περιέχεται στο kit από την κατασκευάστρια εταιρία και η δραστικότητά της δεν επηρεάζεται από το αντιπηκτικό (EDTA) που χρησιμοποιείται για τη συλλογή του πλάσματος.
- iii. Προστίθενται 1.8 ml ειδικού διαλύματος που περιέχει ισοπροπανόλη (ACB) προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί:
- iv. Σύντομη ανάδευση σε συσκευή vortex.
- v. Επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C).
- vi. Σύντομη φυγοκέντρηση.
- vii. Εισάγεται η στήλη QIAamp Mini Colume στη συσκευή κενού, τοποθετείται ειδικός επιμηκυντής στήλης μέσα στην ανοιχτή στήλη και μεταφέρεται όλο το δείγμα στον επιμηκυντή.
- viii. Δημιουργείται κενό έτσι ώστε όλο το δείγμα να περάσει από τη στήλη. Οι στήλες απομόνωσης διαθέτουν μεμβράνη από πήκτωμα σιλικόνης (silica-gel) η οποία συγκρατεί τα μόρια DNA, ενώ δεν δεσμεύει πρωτεΐνες ή άλλα στοιχεία.
- ix. Εκτονώνεται το κενό.
- x. Μετά την έκπλυση του DNA που έχει κατακρατηθεί στη μεμβράνη της στήλης με προσθήκη 600μl διαλύματος έκπλυσης 1 (ACW1), απομακρύνεται ο επιμηκυντής στήλης και κλείνεται η βαλβίδα της συσκευής κενού. Όταν όλο το

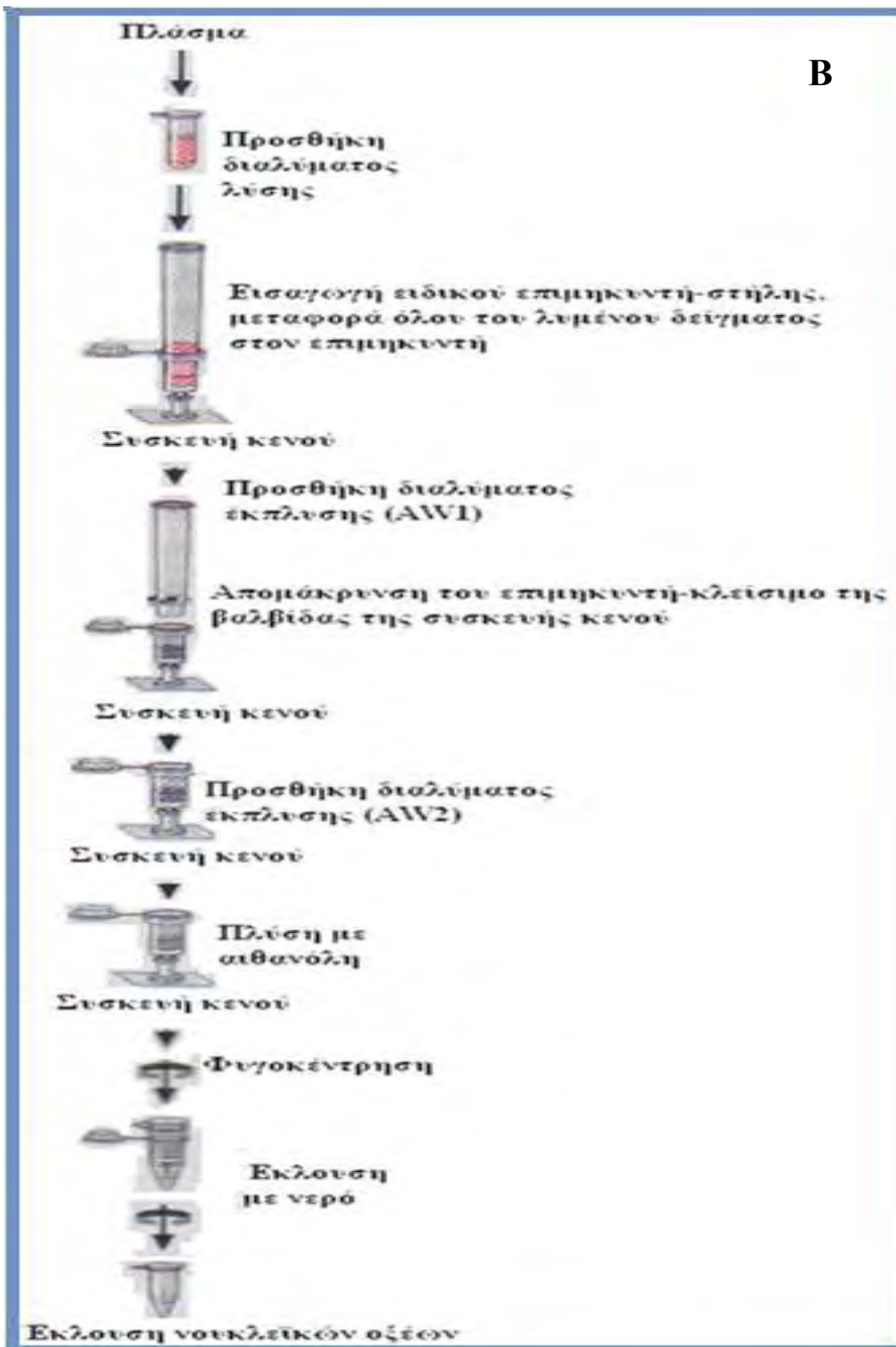
διάλυμα έχει περάσει από τη στήλη, ανοίγεται η βαλβίδα για εκτόνωση του κενού.

- xi. Προστίθενται 750μl διαλύματος έκπλυσης 2 (ACW2) στη στήλη και κλείνεται η βαλβίδα της συσκευής κενού. Όταν όλο το διάλυμα περάσει από τη στήλη, ανοίγεται η βαλβίδα για εκτόνωση του κενού.
- xii. Προστίθενται 750μl αιθανόλης (96-100%) στη στήλη και κλείνεται η βαλβίδα της συσκευής κενού. Όταν όλη η αιθανόλη περάσει από τη στήλη, ανοίγεται η βαλβίδα για εκτόνωση του κενού.
- xiii. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 20000 x g για 1 min.
- xiv. Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωλήνα έκπλυσης και επωάζεται στους 56°C για 5 min για να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα υγρού.
- xv. Προσθήκη στο κέντρο της μεμβράνης 70μl απιονισμένου νερού. Κλείσιμο του πώματος και επώαση της στήλης για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C).
- xvi. Έκλουση του cfDNA από τη μεμβράνη της στήλης με φυγοκέντρηση στα 20000 x g για 1 min.
- xvii. Αποθήκευση των δειγμάτων cfDNA και συντήρηση στους -80°C.

A



Εικόνα 5A: Συσκευή κενού του συστήματος απομόνωσης DNA *QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit* (Qiagen Inc., Germany) .



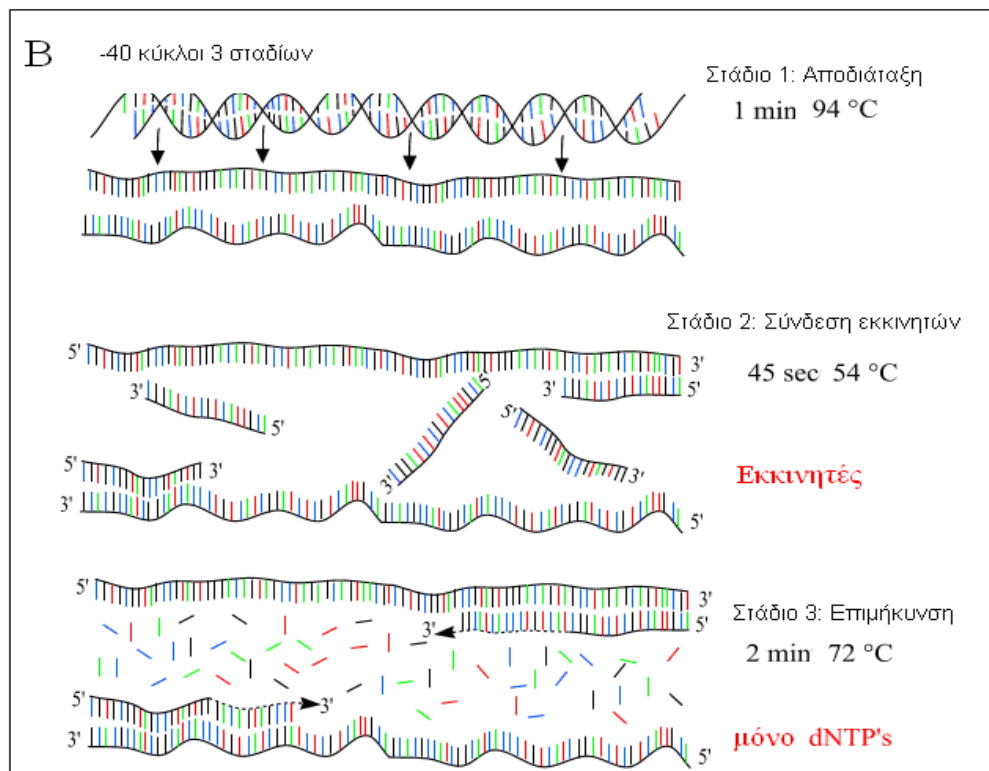
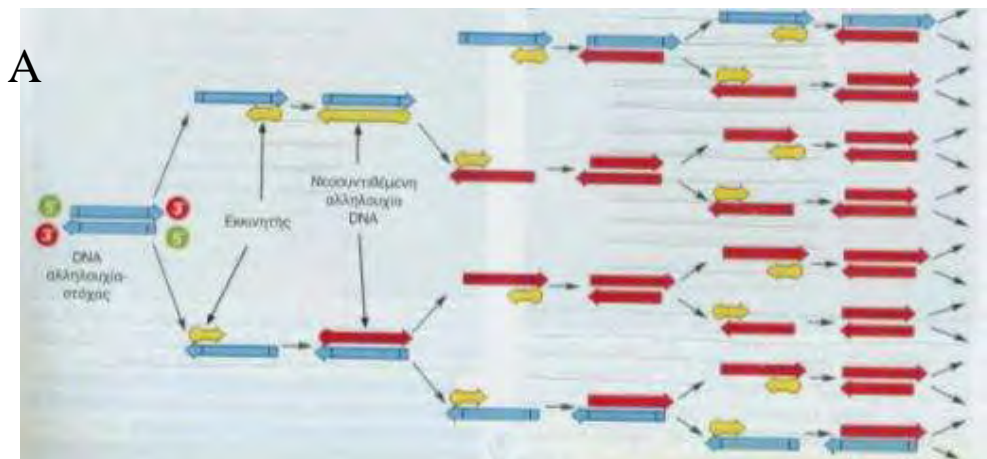
B

Εικόνα 5B: Διαδικασία απομόνωσης cfDNA από το πλάσμα εγκύου με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου συστήματος [QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN)].

5.3.2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Εφευρέτης της τεχνικής PCR είναι ο Kary B. Mullis, ο οποίος το 1990, τιμήθηκε για την καθιέρωση της με βραβείο Nobel Χημείας. Η μέθοδος επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση (amplification) ενός μικρού τμήματος DNA μέχρι και 10^6 φορές σε λίγες μόνο ώρες. Στηρίζεται στη δυνατότητα του ενζύμου Taq (από τον μικροοργανισμό *Thermus Aquaticus* από τον οποίο απομονώθηκε) DNA πολυμεράση, να συνθέτει, παρουσία κατάλληλων συνθηκών, τη συμπληρωματική αλυσίδα ενός τμήματος DNA με κατεύθυνση 5' προς 3', έχοντας ως οδηγό την αλυσίδα μήτρα. Ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA με την τεχνική του PCR πραγματοποιείται μόνο παρουσία συνθετικών τμημάτων DNA μήκους περίπου 15-30 βάσεων που δρουν ως εκκινητές. Οι εκκινητές είναι απόλυτα εξειδικευμένοι και σχεδιάζονται έτσι ώστε να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με τα 3' άκρα των δύο αλυσίδων της ορισμένης αλληλουχίας DNA μήτρας (Εικόνα 6Α).

Η τεχνική PCR περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA και καταστροφής των πιθανώς υπάρχοντων ενδονουκλεασών, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο και τέλος το στάδιο της επιμήκυνσης (Εικόνα 6B). Τα στάδια αυτά αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης και συνήθως επαναλαμβάνονται 25-40 φορές (25-40 κύκλοι)



Εικόνα 6: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR): *A:* Επιλεκτική σύνθεση αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα και *B:* Στάδια της αντίδρασης: 1: Στάδιο αποδιάταξης 2: Στάδιο σύνδεσης των εκκινητών 3: Στάδιο της επιμήκυνσης.

Στο τέλος κάθε κύκλου, το προϊόν της επιμήκυνσης κάθε εκκινητή αποτελεί, μετά από αποδιάταξη, το υπόστρωμα για τους εκκινητές στον επόμενο κύκλο της

αντίδρασης. Η μεταβολή στην ποσότητα των μορίων του DNA μέσα στην αντίδραση ακολουθεί τρεις φάσεις:

1) Background phase: Η αύξηση στη συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης είναι μη ανιχνεύσιμη.

2) Εκθετική (exponential) φάση: Η συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης αυξάνεται εκθετικά.

3) Φάση σταθεροποίησης (Plateau): Η συγκέντρωση του προϊόντος δε μεταβάλλεται. Αυτό οφείλεται είτε στη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της πολυμεράσης, είτε στην εξάντληση κάποιων από τα βασικά συστατικά της αντίδρασης (εκκινητές, dNTP's) ή στον ανταγωνιστικό υβριδισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA, με αποτέλεσμα αδυναμία σύνδεσης των εκκινητών.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε θερμικούς κυκλοποιητές (PCR thermal cyclers) οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία της αντίδρασης κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να επιτρέπουν τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA (Εικόνα 7). Η αντίδραση διεκπεραιώνεται σε σωληνάρια τύπου «eppendorf» σε όγκους 10-100μl. Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει τη μήτρα DNA, εκκινητές, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα και Taq πολυμεράση. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει άλατα και πρόσθετες χημικές ουσίες, ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την σύνδεση των εκκινητών στην αλυσίδα- μήτρα του DNA και την παραγωγή προϊόντος. Εκτός των άλλων συστατικών, το ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει και $MgCl_2$ που έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν την ενεργότητα του ενζύμου και την ενσωμάτωση των dNTPs και να δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για την υβριδοποίηση εκκινητών και μήτρας.



Εικόνα 7: Θερμικοί κυκλοποιητές- PCR thermal cyclers.

5.3.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ PCR

Η αντίδραση πολλαπλού PCR είναι τύπος PCR που επιτρέπει τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό δύο ή περισσότερων διαφορετικών αλληλουχιών-στόχων σε μια μόνο αντίδραση. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Markoulatos και συν. και έκτοτε, δεδομένου ότι εξοικονομεί χρόνο, έχει ευρεία εφαρμογή.

Για την επιτυχή έκβαση μιας αντίδρασης πολλαπλού PCR απαιτείται προσεχτικός σχεδιασμός της μεθόδου, επιλογή των κατάλληλων ζευγών εκκινητών και καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών που επιτρέπουν τον επιτυχή πολλαπλασιασμό όλων των υπό μελέτη αλληλουχιών.

5.3.2.2. ΕΠΙΛΟΓΗ-ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ:

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούνται (Πίνακας 2) επιτρέπουν τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου για τον καθορισμό του συστήματος RhD του εμβρύου, της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας *DYS14* του χρωμοσώματος Y (που χρησιμεύει και ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας της παρουσίας cfDNA στο υπό εξέταση δείγμα στις κηύσεις με έμβρυο αγόρι, κατά τον προσδιορισμό του συστήματος RhD αλλά και για τον προσδιορισμό του φύλου του

εμβρύου), του γονιδίου καθορισμού του φύλου *SRY* για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου, του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A* ως γενικευμένος δείκτης της ύπαρξης cfDNA και του υποκινητή του γονιδίου *ACTB* ως εσωτερικός μάρτυρας επιτυχούς ενζυμικής πέψης με το περιοριστικό ένζυμο. Ο ένας εκ των δύο εκκινητών κάθε ζεύγους που χρησιμοποιείται είναι σημασμένος με FAM φθορίζουσα χρωστική, έτσι ώστε τα προϊόντα της αντίδρασης πολλαπλού PCR να μπορούν να αναλυθούν στο σύστημα ανάλυσης AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Πίνακας 2: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούνται

ΣΤΟΧΟΣ	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (bp)	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΘΕΣΗ
RHD exon 7	*RHD-ex7 f	5'-GGG TGT TGT AAC CGA GTG CTG-3'	125	1p34-p36
RHD exon 7	RHD-ex7 r	5'-CCG GCT CCG ACG GTA TC-3'	125	1p34-p36
RHD exon 10	*RHD-ex10 f	5'-CTC TCA CTG TTG CCT GCA T-3'	134	1p34-p36
RHD exon 10	RHD-ex10 r	5'-ATG GTG AGA TTC TCC TCA AAG AGT -3'	134	1p34-p36
SRY	*SRY f	5'-GGC AAC GTC GTC CAG GAT AGA GTG A-3'	115	Yp11.3

SRY	SRY r	5'-TGC TGA TCT CTG AGT TTC GCA TT-3'	115	Yp11.3
DYS14	DYS14 f	5'-GGG CCA ATG TTG TAT CCT TCT C-3'	84	Yp11.2
DYS14	DYS14 r	5'-GCC CAT CGG TCA CTT ACA CTT C-3'	84	Yp11.2
RASSF1A	*RSF f	5'-AGC CTG AGC TCA TTG AGC TG-3'	150	3p21.3
RASSF1A	RSF r	5'-ACC AGC TGC CGT GTG G-3'	150	3p21.3
Beta-Actin	*ACTB f	5'-GCG CCG TTC CGA AAG TT-3'	130	7p22
Beta-Actin	ACTB r	5'-GGG TGT GGA CGG GCG-3'	130	7p22

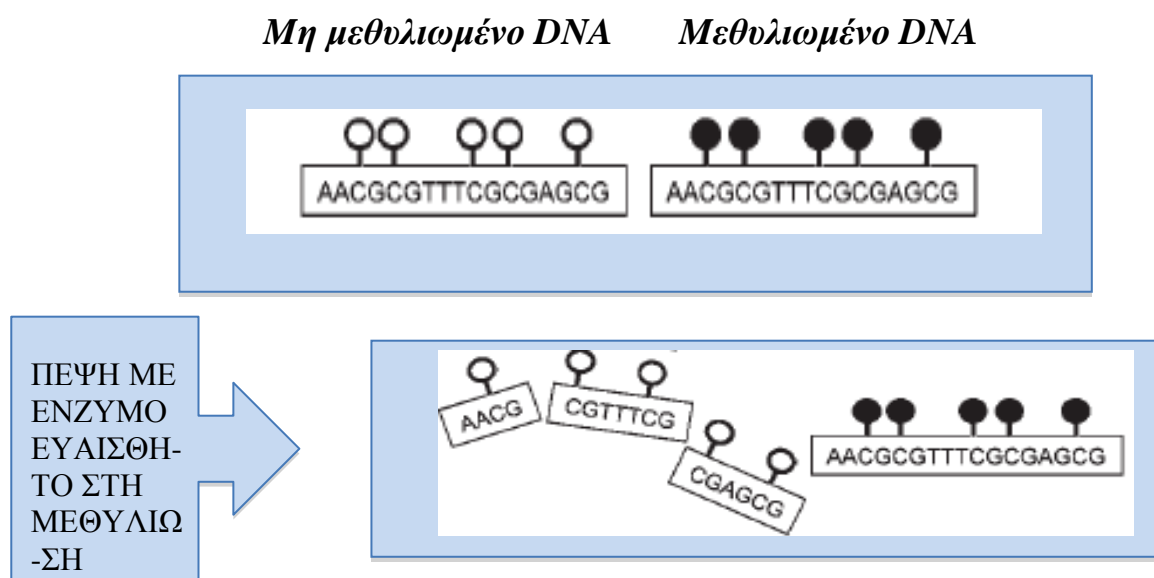
*Σήμανση με φθορίζουσα χρωστική FAM στο 5' άκρο

f: forward εκκινητής, r: reverse εκκινητής

Η ενζυμική πέψη χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών *RASSF1A*, ενώ οι μεθυλιωμένες αλληλουχίες παραμένουν άθικτες. Ο υποκινητής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A* είναι γνωστό ότι παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης στον πλακούντα από το περιφερικό αίμα και είναι μεθυλιωμένος στο έμβρυο και μη μεθυλιωμένος στα κύτταρα του περιφερικού αίματος της μητέρας. Μετά από ενζυμική πέψη, οι αλληλουχίες *RASSF1A* μητρικής προέλευσης απομακρύνονται ενώ οι εμβρυικές αλληλουχίες παραμένουν άθικτες και

μπορούν στη συνέχεια να ανιχνευθούν. Το γονίδιο *RASSF1A* συνεπώς χρησιμοποιείται ως δείκτης για την επιβεβαίωση εμβρυικού υλικού, ανεξαρτήτως του φύλου ή των πολυμορφισμών του εμβρύου.

Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η ευαίσθητη στη μεθυλίωση περιοριστική ενδονουκλεάση *AciI* (New England Biolabs, Inc., USA), λόγω της ικανότητάς της να αναγνωρίζει θέσεις κοπής μόνο στις επιλεγμένες *RASSF1A* και *ACTB* μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες, ενώ οι επιλεγμένες αλληλουχίες των *RHD* και *SRY* γονιδίων παραμένουν άθικτες (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *AciI* ευαίσθητο στη μεθυλίωση. Το περιοριστικό ένζυμο *AciI* αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...CCGC...3' με αποτέλεσμα την ενζυμική πέψη μόνο των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών μητρικής προέλευσης ενώ οι μεθυλιωμένες αλληλουχίες του εμβρύου παραμένουν ανέπαφες.

5.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ PCR

Το πρωτόκολλο που έχει καθοριστεί από το εργαστήριο, μετά από πολλές δοκιμές, για την αντίδραση πολλαπλού PCR, με τελικό όγκο 50μl, περιλαμβάνει:

- 25μl από το προ-αναμεμιγμένο διάλυμα buffer/dNTPs/MgCl₂/Taq πολυμεράση (HotStarTaq, Qiagen Inc., Hilden, Germany)
- 8% Betaine
- 4% DMSO
- εκκινητές των οποίων η συγκέντρωση αναγράφεται στον Πίνακα 3

Το πρόγραμμα του πολλαπλού PCR περιελάμβανε: 15min αποδιάταξης στους 95°C, 40 κύκλους στον καθένα εκ των οποίων επαναλαμβάνονται τα εξής τρία βήματα: 95°C για 30sec (αποδιάταξη), 55°C για 45sec (σύνδεση) και 72°C για 45sec (επιμήκυνση). Ακολουθούν 10min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση.

5.6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται μόνο όταν:

- Δεν παρατηρείται επιμόλυνση κατά τη διαδικασία της ενζυμικής πέψης και της αντίδραση πολλαπλού PCR, δηλαδή δεν ανιχνεύονται αλληλουχίες στα δείγματα που αποτελούν μάρτυρες επιμόλυνσης (blanks).
- Είναι επιτυχής η ενζυμική πέψη (δεν ανιχνεύονται αλληλουχίες *ACTB* σε κανένα δείγμα και αλληλουχίες *RASSF1A* ανιχνεύονται μόνο στα δείγματα DNA από βιοψία τροφοβλάστης και όχι στο γενωμικό DNA περιφερικού αίματος άνδρα δότη που έχουν υποβληθεί σε πέψη.

5.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RhD ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φαίνονται στον Πίνακα 3

- ✚ Ένα έμβρυο χαρακτηρίζεται ως RhD-αρνητικό όταν δεν παρατηρείται πολλαπλασιασμός των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου και ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται η παρουσία εμβρυϊκού DNA στο υπό-μελέτη δείγμα με ανίχνευση *RASFFAI* και/ή *DYS14* αλληλουχιών, απουσία πολλαπλασιασμού *ACTB* αλληλουχιών (Πρότυπο 1).
- ✚ Ένα έμβρυο χαρακτηρίζεται RhD-θετικό όταν παρατηρείται πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου, τουλάχιστον μία φορά το καθένα στα δύο αντίγραφα PCR (Πρότυπα 2-6).
- ✚ Ανίχνευση μόνο της αλληλουχίας του εξονίου 7 του *RHD* γονιδίου και στα δύο αντίγραφα αποτελεί μόνο ένδειξη RhD-θετικού εμβρύου. Στην περίπτωση αυτή η απουσία πολλαπλασιασμού του εξονίου 10 του *RHD* γονιδίου οφείλεται πιθανώς στη μικρή ποσότητα cfDNA στο δείγμα και συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας με νέο δείγμα σε πιο προχωρημένο στάδιο της κύησης (συνήθως 1-2 εβδομάδες αργότερα) (Πρότυπο 7).
- ✚ Ανίχνευση μόνο της αλληλουχίας του εξονίου 10 του *RHD* γονιδίου και στα δύο αντίγραφα αποτελεί ένδειξη πολυμορφίας (variant) του *RHD* γονιδίου που μπορεί να οδηγεί είτε σε RhD θετικό είτε αρνητικό φαινότυπο [11]. Στην περίπτωση αυτή προτείνεται έλεγχος του DNA των γονέων

προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα ύπαρξης της πολυμορφίας στους γονείς (Πρότυπο 8).

- ✚ Όταν ανιχνεύεται μόνο η αλληλουχία του εξονίου 7 ή μόνο του εξονίου 10 του *RHD* γονιδίου μία φορά στα δύο αντίγραφα ο προσδιορισμός του συστήματος RhD του εμβρύου δεν είναι εφικτός (τεχνικό σφάλμα) και γίνεται επανάληψη της δοκιμασίας από υλικό που είναι αποθηκευμένο στους -80°C (Πρότυπα 9 και 10).
- ✚ Όταν δεν ανιχνεύεται καμία από τις αλληλουχίες των *RHD* (εξόνια 7 και 10), *DYS14* και *RASSF1A* πιθανολογείται ότι πρόκειται για τεχνικό σφάλμα ή απουσία cfDNA από το δείγμα και η δοκιμασία επαναλαμβάνεται με πλάσμα που έχει αποθηκευθεί στους -80°C.

Πίνακας 3: Κριτήρια αξιολόγησης αποτελεσμάτων-Διάγνωση του συστήματος RhD του εμβρύου					
Πρότυπο	Αντίγραφο 1		Αντίγραφο 2		Σύστημα RhD του εμβρύου
	εξόνιο 7	εξόνιο 10	εξόνιο 7	εξόνιο 10	
1	-	-	-	-	RhD-αρνητικό
2	+	+	+	+	RhD-θετικό
3	+	+	+	-	RhD-θετικό
4	+	+	-	+	RhD-θετικό
5	+	+	-	-	RhD-θετικό

6	+	-	-	+	RhD-θετικό
7	+	-	+	-	RhD-θετικό*
8	-	+	-	+	Πιθανώς RhD-θετικό **
9	+	-	-	-	Μη εφικτός προσδιορισμός ***
10	-	+	-	-	Μη εφικτός προσδιορισμός ***

* Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας με νέο δείγμα αίματος 1-2 εβδομάδες μετά

** Συνιστάται έλεγχος του DNA των γονέων για διερεύνηση παρουσίας *RHD* πολυμορφίας

*** Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας από άλλο δείγμα πλάσματος που έχει αποθηκευθεί στους -80°C.

5.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων φαίνονται στον Πίνακα 4.

- ✚ Όταν δεν ανιχνεύεται καμία από τις αλληλουχίες *DYS14* και *SRY* αλλά πολλαπλασιάζεται η αλληλουχία *RASSF1A* που επιβεβαιώνει την ύπαρξη cfDNA στο δείγμα, το έμβρυο χαρακτηρίζεται ως κορίτσι.
- ✚ Τα έμβρυα χαρακτηρίζονται ως αγόρια όταν ανιχνεύονται οι αλληλουχίες *DYS14* και *SRY*. Στην περίπτωση αυτή δεν είναι απαραίτητος ο ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός του *RASSF1A* γιατί οι ειδικές αλληλουχίες

του χρωμοσώματος Υ επιβεβαιώνουν την παρουσία εμβρυικού υλικού στο δείγμα.

- ✚ Ανίχνευση μόνο της αλληλουχίας *DYS14* αποτελεί μόνο ένδειξη ότι το έμβρυο είναι αγόρι. Στην περίπτωση αυτή η απουσία του γονιδίου *SRY* μπορεί να αποδοθεί πιθανώς στη μικρή ποσότητα cffDNA και συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας σε πλάσμα από νέα αιμοληψία σε πιο προχωρημένο στάδιο της κύησης (συνήθως 1 εβδομάδα αργότερα).
- ✚ Στις περιπτώσεις που ανιχνεύεται μόνο η αλληλουχία *SRY* ο προσδιορισμός του φύλου του εμβρύου δεν είναι εφικτός γιατί μπορεί να οφείλεται σε τεχνική αποτυχία. Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας από το υλικό που είναι αποθηκευμένο στους -80 °C.
- ✚ Όταν δεν ανιχνεύεται καμία από τις τρεις αλληλουχίες (*DYS14*, *SRY* και *RASSF1A*) συνιστάται επανάληψη.

Πίνακας 4. Κριτήρια αξιολόγησης αποτελεσμάτων				
<i>DYS14</i>	<i>SRY</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>ACTB</i>	ΦΥΛΟ ΕΜΒΡΥΟΥ
-	-	+	-	Κορίτσι
+	+	+	-	Αγόρι
+	-	+	-	Πιθανώς αγόρι*
-	+	+	-	Μη εφικτός προσδιορισμός **

-	-	-	-	Μη εφικτός προσδιορισμός **
---	---	---	---	------------------------------------

* Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας από νέο δείγμα αίματος 1 βδομάδα μετά.

** Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας από άλλο δείγμα πλάσματος που έχει αποθηκευθεί στους -80 °C

5.9. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ ΠΡΟΣ ΑΠΟΦΥΓΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΕΩΝ

Για την αποφυγή και τον έλεγχο επιμολύνσεων, σε κάθε πείραμα τηρούνται αυστηρά συνθήκες προστασίας [12, 13] :

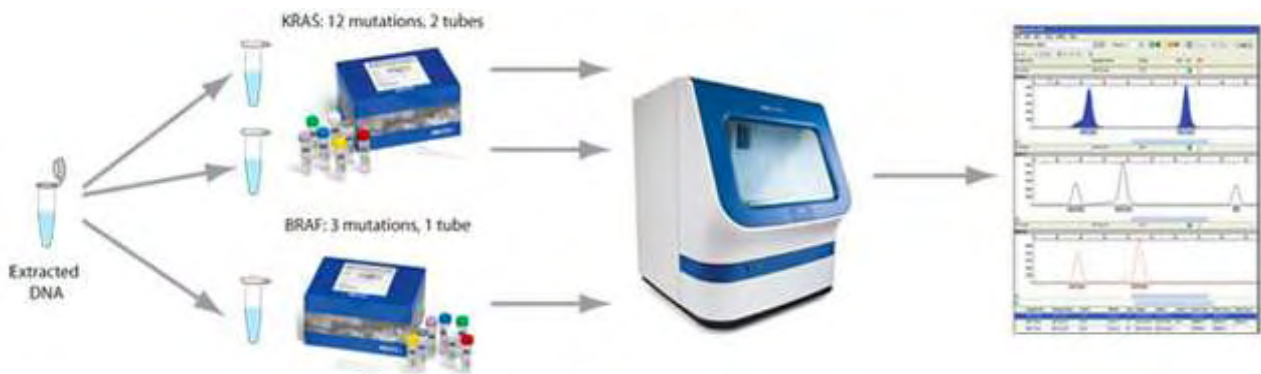
1. Τα αντιδραστήρια μοιράζονται σε ίσες μικρές ποσότητες (aliquots) ώστε να αποφεύγεται η συνεχής ψύξη-απόψυξή τους και να μειώνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης.
2. Απομόνωση του χώρου φύλαξης των αντιδραστηρίων και προετοιμασίας του PCR.
3. Χρήση εξοπλισμού [πιπέτες, ρύγχη (tips) με φίλτρο, σωληνάρια (eppendorfs)] αποκλειστικά για τα συγκεκριμένα πειράματα.
4. Ακτινοβολήση με UV όλων των αντιδραστηρίων, πιπετών και σωληναρίων πριν τη χρήση τους.
5. Όλα τα σωληνάρια, τα ρύγχη και τα αντιδραστήρια (H₂O, πρωτεΐνάση, κ.α.) είναι ελεύθερα ενζύμων που κατακερματίζουν τα μόρια RNA και DNA (RNase, DNase free).
6. Χρήση ρυγχών με φίλτρο (ρύγχη με φίλτρο, sterilized RNase free, DNase free).

7. Χρήση γαντιών χωρίς πούδρα (non powder), τα οποία αλλάζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
8. Προσεκτικός χειρισμός των σωληναρίων ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση από ξένο DNA (τα σωληνάρια δεν πρέπει να παραμένουν ανοιχτά και τα κλείνουμε μετά από κάθε χειρισμό).
9. Κάθε σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει δείγματα-μάρτυρες τα οποία δεν περιέχουν DNA. Ένδειξη πολλαπλασιασμού σε κάποιο ή κάποια από αυτά τα δείγματα αποτελεί ένδειξη μόλυνσης σε επί μέρους υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην όλη διαδικασία ή σε εκτεταμένη επιμόλυνση.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την διάρκεια της μελέτης μελετήθηκαν 30 δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων, 18 από RhD-αρνητικές εγκύους με RhD-θετικό σύντροφο, και παραπέμφθηκαν για προγεννητικό προσδιορισμό του συστήματος RhD του εμβρύου, 12 δείγματα από εγκύους με οικογενειακό ιστορικό φυλοσύνδετων νοσημάτων που παραπέμφθηκαν για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου.

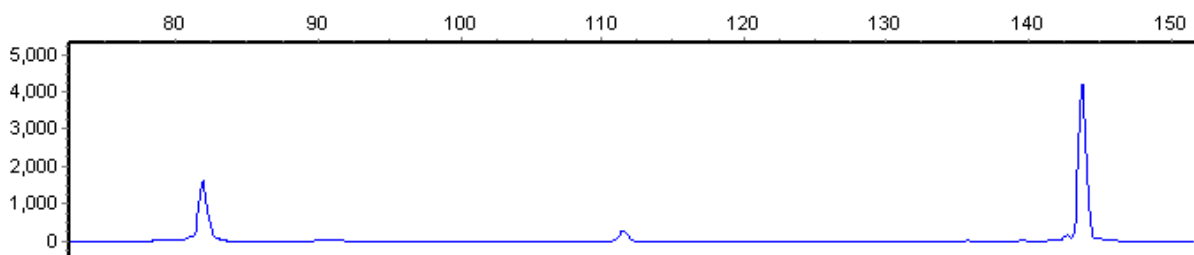
Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της πολλαπλής αντίδρασης PCR προσδιορίστηκαν στον αυτόματο αναλυτή αλληλούχισης AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)(Εικόνα 9).



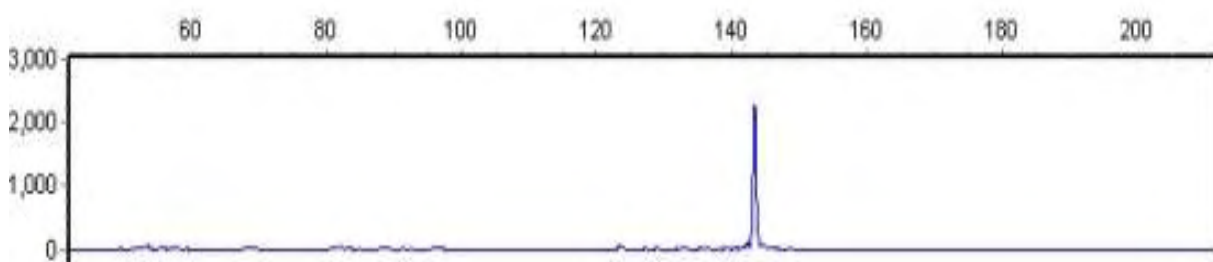
Εικόνα 9: Αυτόματος αναλυτής αλληλούχησης AB 3500 Genetic Analyzer.

Ο αναλυτής χρησιμοποιεί το προϊόν Rox sizer που περιέχει αλληλουχίες γνωστού μεγέθους ώστε να αναγνωρίσει και να προσδιορίσει το μέγεθος των αλληλουχιών που ανιχνεύονται στα υπό μελέτη δείγματα.

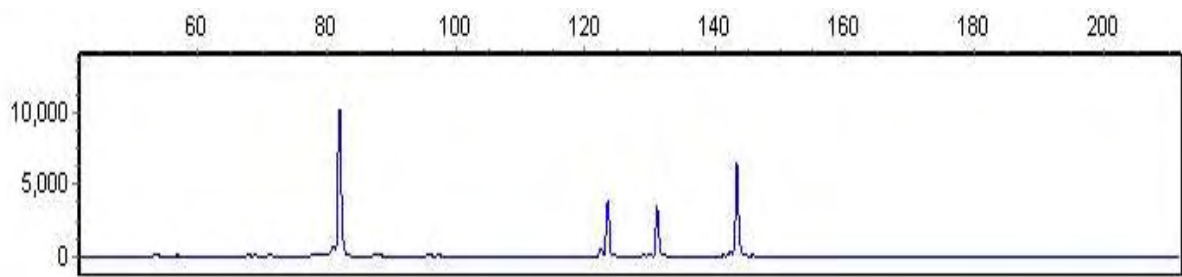
✚ RhD-αρνητικό έμβρυο, αγόρι:



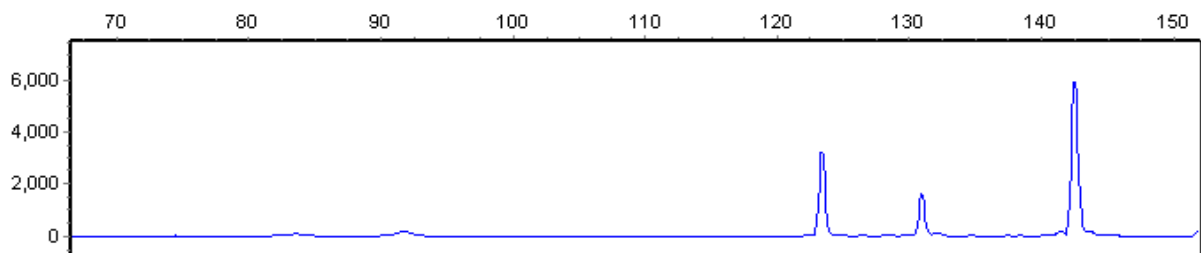
✚ RhD-αρνητικό έμβρυο, κορίτσι:



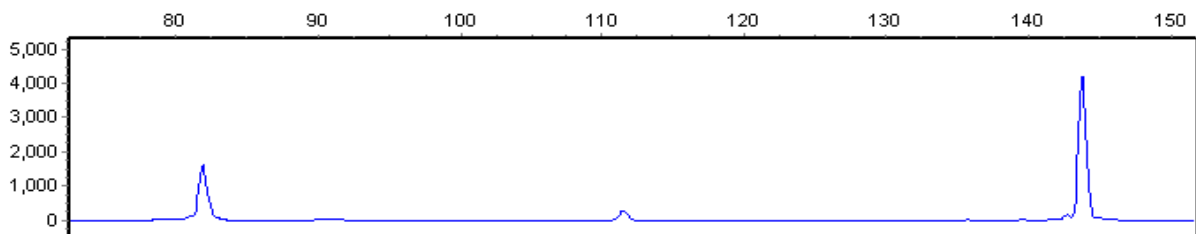
✚ RhD-θετικό έμβρυο, αγόρι:



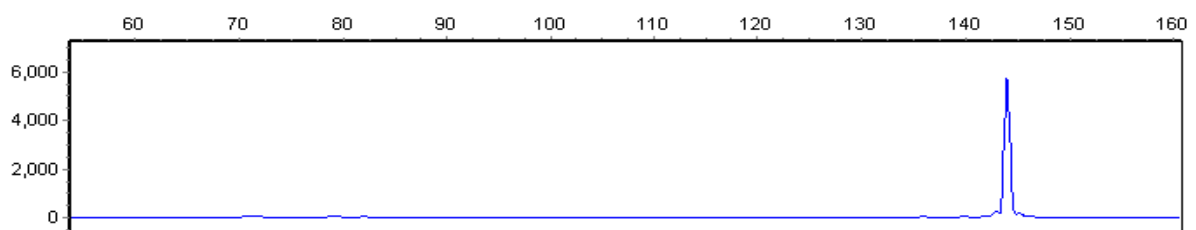
✚ RhD-θετικό έμβρυο, κορίτσι:



✚ Αγόρι:



✚ Κορίτσι:



6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ RHD ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Με τον 1^ο κύκλο εφαρμογής της μεθοδολογίας, διαγνώστηκαν 17/18 δείγματα. Ανίχνευση αλληλουχιών των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου έγινε σε 11/18 δείγματα (RhD-θετικά έμβρυα). Σε 6/18 δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες του γονιδίου *RHD* και η παρουσία εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση αλληλουχιών *RASSF1A* ή/και *DYS14* (RhD-αρνητικά έμβρυα). Σε 1/18 δείγματα δεν ανιχνεύτηκε καμία από τις υπό μελέτη αλληλουχίες. Στη περίπτωση αυτή τέθηκε η υποψία απουσίας εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα και γι αυτό μελετήθηκε νέο δείγμα από αιμοληψία που έγινε 2 εβδομάδες μετά την αρχική. Κατά τη μελέτη του δείγματος της 2^{ης} αιμοληψίας ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες των εξονίων 7 και 10 του *RHD* γονιδίου και διαγνώστηκε η παρουσία RhD-θετικού εμβρύου.

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του συστήματος RhD, για όλα τα έμβρυα τα οποία ελέγχθηκαν, ήταν ακριβής και επιβεβαιώθηκε με ορολογικές μεθόδους στα μαιευτήρια μετά τον τοκετό.

6.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Με τον 1^ο κύκλο εφαρμογής της μεθοδολογίας, διαγνώστηκαν 12/12 δείγματα. Ανίχνευση αλληλουχιών των *SRY* και *DYS14* γονιδίων έγινε σε 7/12 δείγματα (έμβρυα αγόρια) ενώ σε 5/12 δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν οι αλληλουχίες αυτές και η παρουσία εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση αλληλουχιών *RASSF1A* (έμβρυα κορίτσια).

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του φύλου του εμβρύου έχει αποδειχθεί ακριβής σε όλα τα έμβρυα.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από το περιφερικό αίμα της εγκύου υπερέχει των επεμβατικών τεχνικών γιατί είναι ακίνδυνος για το έμβρυο και την κύηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κυήσεις RhD-αρνητικών εγκύων εκτός του μικρού αλλά υπαρκτού κινδύνου αποβολής (0.5-1%) η χρησιμοποίηση επεμβατικών τεχνικών προγεννητικού ελέγχου έχει επιπλέον κίνδυνο ευαισθητοποίησης της RhD-αρνητικής εγκύου λόγω εμβρυομητρικής μετάγγισης κατά τη διαδικασία της αμνιοπαρακέντησης ή της βιοψίας τροφοβλάστης [28].

Επιπλέον, η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση δίνει τη δυνατότητα πρώιμης διάγνωσης ακόμη και από την 7^η εβδομάδα της κύησης, ενώ με τη χρήση των επεμβατικών τεχνικών η διάγνωση δεν μπορεί να παραγματοποιηθεί πριν την 11^η-12^η εβδομάδα κύησης.

Στη παρούσα μελέτη, η για λήψη του δείγματος χρησιμοποιήθηκε αντιπηκτικό EDTA, το οποίο προστατεύει τη μεμβράνη των λευκοκυττάρων και εμποδίζει τη λύση τους [29, 30]. Η απομόνωση του πλάσματος έγινε το αργότερο 4 ώρες μετά την αιμοληψία, επειδή καθυστέρηση προκαλεί λύση των κυττάρων μητρικής προέλευσης, αύξηση της συγκέντρωσης του cfDNA και κατά συνέπεια αύξηση του λόγου cfDNA/cffDNA [31].

Πριν από την αιμοληψία είχε προηγηθεί υπερηχογραφικός έλεγχος προκειμένου να προσδιοριστεί επακριβώς η ηλικία κύησης, να επιβεβαιωθεί η βιωσιμότητα του

εμβρύου, να αποκλειστεί το ενδεχόμενο δίδυμης κύησης, και η παρουσία δεύτερου κενού εμβρυϊκού σάκου (vanishing twin) που μπορεί να περιπλέξει τη διάγνωση.

Μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσία πλακούντα, ακόμη και χωρίς έμβρυο εξακολουθεί να παράγει εμβρυϊκό υλικό δεδομένου ότι το cfDNA προέρχεται κυρίως από τον πλακούντα [32].

Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του συστήματος RhD του εμβρύου σε κυήσεις RhD-αρνητικών γυναικών μπορεί να ελαττώσει σημαντικά τη προληπτική χορήγηση αντί-D που σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική γίνεται σε όλες τις RhD-αρνητικές εγκύους ανεξάρτητα του συστήματος RhD του εμβρύου. Γνώση του συστήματος RhD του εμβρύου μπορεί να περιορίσει τη χορήγηση αντί-D μόνο σε όσες υπάρχει πραγματική ένδειξη, δεδομένου ότι ζητήματα που σχετίζονται με τη χρήση της δεν έχουν πλήρως επιλυθεί [33, 34]. Η αντί-D προέρχεται από ανθρώπινο ορό και παρά τους ενδεδειγμένους και ενδεδειγμένους ελέγχους, υπάρχει πάντα ο θεωρητικός κίνδυνος μετάδοσης σοβαρού λοιμώδους νοσήματος [35, 36]. Επιπλέον τα αποθέματα αντί-D παγκοσμίως δεν είναι απεριόριστα και η οικονομική επιβάρυνση που προκύπτει από τη χορήγησή της είναι σημαντική.

Σε περίπτωση ήδη ευαισθητοποιημένης εγκύου η γνώση του συστήματος RhD του εμβρύου νωρίς κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να συμβάλλει αποφασιστικά στο τρόπο παρακολούθησης κάθε εγκυμοσύνης, δεδομένου ότι οι κυήσεις ευαισθητοποιημένων RhD-αρνητικών γυναικών που κυοφορούν RhD-θετικό έμβρυο είναι υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση αιμολυτικής νόσου του νεογνού ή του εμβρύου.

Πρώιμη ανίχνευση του συστήματος RhD του εμβρύου έχει σημαντικό ρόλο στον τρόπο αντιμετώπισης κυήσεων RhD-αρνητικών εγκύων το 1^ο τρίμηνο της κύησης σε περίπτωση αυτόματης ή τεχνητής διακοπής, τραυματισμών στη κοιλιακή χώρα, επεμβάσεων προγεννητικού ελέγχου ή σε αποκόλληση του πλακούντα [37].

Στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο του συστήματος RhD του εμβρύου ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορούν να χαρακτηριστούν «καταστροφικά». Σε μη ευασθητοποιημένες εγκύους μπορεί να οδηγήσουν σε μη χορήγηση αντί-D σφαιρίνης, με αποτέλεσμα την ευαισθητοποίησή τους, ενώ όταν η έγκυος είναι ήδη ευαισθητοποιημένη η κύηση δεν θα τεθεί σε εντατική ιατρική παρακολούθηση ως κύηση «υψηλού κινδύνου», ενώ ένα RhD-θετικό έμβρυο κινδυνεύει άμεσα από αιμολυτική νόσο. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε ποσότητα εμβρυϊκού υλικού στο υπό μελέτη δείγμα μικρότερη από αυτή που μπορεί να ανιχνευθεί με τις τεχνικές PCR. Η μικρή ποσότητα εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα, ειδικά το 1^ο τρίμηνο της κύησης, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η διάγνωση των RhD-αρνητικών εμβρύων είναι έμμεση και γίνεται όταν δεν ανιχνεύονται στο πλάσμα της εγκύου RhD αλληλουχίες, δυσκολεύει την ερμηνεία των αρνητικών αποτελεσμάτων και αυξάνει τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών. Για το λόγο αυτό προτείνεται η χρησιμοποίηση εμβρυϊκών δεικτών, η ανίχνευση των οποίων θα επιβεβαιώνει τη παρουσία cffDNA στο δείγμα [38, 39]. Στην παρούσα μελέτη ως γενικευμένος εμβρυϊκός δείκτης χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς η αλληλουχία του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A* που είναι μεθυλιωμένος στον πλακούντα και μη μεθυλιωμένος στα κύτταρα της μητέρας. Επιπλέον στις κυήσεις με έμβρυο αγόρι ανιχνεύτηκε και η αλληλουχία *DYS14*.

Πρώιμη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του φύλου του εμβρύου σε κυήσεις με αυξημένο κίνδυνο φυλοσύνδετου νοσήματος, έχει τη δυνατότητα να ελαττώσει κατά το ήμισυ σχεδόν τον αριθμό των επεμβατικών προγεννητικών ελέγχων από βιοψία τροφοβλάστης περιορίζοντάς τους μόνο στις εγκύους που κυοφορούν έμβρυο αγόρι. Σε κυήσεις αυξημένου κινδύνου για συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων πρώιμη ανίχνευση του φύλου του εμβρύου πριν την 8^η εβδομάδα της κύησης μπορεί να περιορίσει τη προληπτική χορήγηση δεξαμεθαζόνης μόνο στις εγκύους που κυοφορούν έμβρυο κορίτσι και έχουν κίνδυνο αρρενοποίησης. Το γεγονός ότι ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του φύλου του εμβρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί ήδη από την 7^η εβδομάδα της κύησης αποτελεί σαφές πλεονέκτημα έναντι του υπερηχογραφήματος το οποίο μπορεί με αξιοπιστία να ανιχνεύσει το φύλο μόνο μετά την 11^η εβδομάδα, όταν έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων

Η επιβεβαίωση της παρουσίας εμβρυικού υλικού στο δείγμα έγινε με τη χρησιμοποίηση αλληλουχιών του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1A*. Το *RASSF1A* βρίσκεται στο αυτοσωματικό χρωμόσωμα 3 και δεν εξαρτάται από το φύλο του εμβρύου

Για τον προσδιορισμό του φύλλου του εμβρύου, πραγματοποιείται ανίχνευση του γονιδίου *SRY* και του γονιδίου *TSPY* στο οποίο βρίσκεται η αλληλουχία *DYS14*. Το γονίδιο *TSPY* αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες για αυτό και έχει χαμηλότερο (υποδεκαπλάσιο) όριο ανίχνευσης σε σχέση με το *SRY* γεγονός που διευκολύνει τη διάγνωση νωρίς κατά την κύηση. Ανίχνευση εμβρύων-κοριτσιών γίνεται έμμεσα, όταν δεν ανιχνεύονται αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y στο υπό

μελέτη δείγμα. Η διάγνωση είναι εφικτή ήδη από την 7η εβδομάδα της κύησης με ακρίβεια και ειδικότητα που πλησιάζει το 100% στις πρόσφατες μελέτες .

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε έχει την αξιοπιστία και ειδικότητα που απαιτεί ο προγεννητικός έλεγχος και μπορεί με ασφάλεια να χρησιμοποιηθεί από όλες τις εγκύους. Επιπλέον η μέθοδος είναι γρήγορη, χαμηλού κόστους και απαιτεί εργαστηριακό εξοπλισμό που υπάρχει σε όλα τα εργαστήρια που παρέχουν υπηρεσίες μοριακής ιατρικής. Παρά το ότι η αξιοπιστία της διάγνωσης απαιτείται κάθε φορά να ενημερώνονται οι γονείς για την πιθανότητα λάθους και την πιθανότητα επανάληψης της διαδικασίας με νέα αιμοληψία. Σε όλες τις περιπτώσεις σύμφωνα με τη διεθνή πρακτική το φύλο του εμβρύου πρέπει να επιβεβαιώνεται υπερηχογραφικά μετά την 11^η εβδομάδα της κύησης.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mandel, P. and P. Metais. *Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme*. CR Acad. Sci. Paris, 142: 241-243, **1948**.
2. Leon, S.A., G.E. Ehrlich, B. Shapiro, and V.A. Labbate. *Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients*. J Rheumatol, 4(2): 139-43, **1977**.
3. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V. et al., Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997, 350, 485-7.
4. Lo, Y.M., N.M. Hjelm, C. Fidler, I.L. Sargent, M.F. Murphy, P.F. Chamberlain, P.M. Poon, C.W. Redman, and J.S. Wainscoat. *Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma*. N Engl J Med, 339(24): 1734-8, **1998**.
5. Poon, L.L., T.N. Leung, T.K. Lau, and Y.M. Lo. *Presence of fetal RNA in maternal plasma*. Clin Chem, 46(11): 1832-4, **2000**.
6. Honda, H., N. Mihar, Y. Ohashi, O. Samura, M. Kinutani, T. Hara, and K. Ohama. *Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum*. Hum Genet, 110(1): 75-9, **2002**.
7. Sekizawa, A., T. Kondo, M. Iwasaki, A. Watanabe, M. Jimbo, H. Saito, and T. Okai. *Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma*. Clin Chem, 47(10): 1856-8, **2001**.
8. Rijnders, R.J., C.E. van der Schoot, B. Bossers, M.A. de Vroede, and G.C. Christiaens. *Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia*. Obstet Gynecol, 98(3): 374-8, **2001**.
9. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V. et al., Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997, 350, 485-7.
10. Lun, F.M., Chiu, R.W., Allen Chan, K.C., Yeung Leung, T. et al., Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008, 54, 1664-72.
11. Bianchi, D.W., Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 2004, 25 Suppl A, S93-S101.
12. Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K. et al., Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999, 64, 218-24.
13. Lo, Y.M., Molecular testing of urine: catching DNA on the way out. *Clin Chem* 2000, 46, 1039-40.
14. Wright, C.F., Burton, H., The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009, 15, 139-51.
15. Finning, K.M., Martin, P.G., Soothill, P.W., Avent, N.D., Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002, 42, 1079-85.
16. Faas, B.H., E.A. Beuling, G.C. Christiaens, A.E. von dem Borne, and C.E. van der Schoot. *Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma*. Lancet, 352(9135): 1196, **1998**.
17. Daniels, G., C.E. van der Schoot, and M.L. Olsson. *Report of the Second International Workshop on molecular blood group genotyping*. Vox Sang, 93(1): 83-8, **2007**.
18. Aubin, J.T., C. Le Van Kim, I. Mouro, Y. Colin, C. Bignozzi, Y. Brossard, and J.P. Cartron. *Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification*. Br J Haematol, 98(2): 356-64, **1997**.

-
- 19 . Rouillac-Le Sciellour, C., P. Puillandre, R. Gillot, C. Baulard, S. Metral, C. Le Van Kim, J.P. Cartron, Y. Colin, and Y. Brossard. *Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women.* Mol Diagn, 8(1): 23-31, **2004**.
 - 20 . van der Schoot, C.E., S. Hahn, and L.S. Chitty. *Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status.* Semin Fetal Neonatal Med, 13(2): 63-8, **2008**.
 - 21 . Finning, K., P. Martin, J. Summers, E. Massey, G. Poole, and G. Daniels. *Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study.* BMJ, 336(7648): 816-8, **2008**.
 - 22 . Bowman, J.M. *The management of Rh-Isoimmunization.* Obstet Gynecol, 52(1): 1-16, **1978**.
 - 23 . Soothill, P.W., K.H. Nicolaides, and C.H. Rodeck. *Effect of anaemia on fetal acid-base status.* Br J Obstet Gynaecol, 94(9): 880-3, **1987**.
 - 24 . Soothill, P.W., K.H. Nicolaides, C.H. Rodeck, W.H. Clewell, and J. Lindridge. *Relationship of fetal hemoglobin and oxygen content to lactate concentration in Rh isoimmunized pregnancies.* Obstet Gynecol, 69(2): 268-71, **1987**.
 - 25 . Bowman, J.M. *The management of Rh-Isoimmunization.* Obstet Gynecol, 52(1): 1-16, **1978**.
 - 26 . Avent, N.D. *RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges.* Methods Mol Biol, 444: 185-201, **2008**.
 - 27 . Avent, N.D. *Large-scale blood group genotyping: clinical implications.* Br J Haematol, 144(1): 3-13, **2009**.
 - 28 . Chiu, R.W., K.C. Chan, Y. Gao, V.Y. Lau, W. Zheng, T.Y. Leung, C.H. Foo, B. Xie, N.B. Tsui, F.M. Lun, B.C. Zee, T.K. Lau, C.R. Cantor, and Y.M. Lo. *Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 105(51): 20458-63, **2008**.
 - 29 . Lam, N.Y., T.H. Rainer, R.W. Chiu, and Y.M. Lo. *EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis.* Clin Chem, 50(1): 256-7, **2004**.
 - 30 . Benn, P., A. Borrell, H. Cuckle, L. Dugoff, S. Gross, J.A. Johnson, R. Maymon, A. Odibo, P. Schielen, K. Spencer, D. Wright, and Y. Yaron. *Prenatal Detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011.* Prenat Diagn, 32(1): 1-2, **2012**.
 - 31 . Angert, R.M., E.S. LeShane, Y.M. Lo, L.Y. Chan, L.C. Delli-Bovi, and D.W. Bianchi. *Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples.* Clin Chem, 49(1): 195-8, **2003**.
 - 32 . Finning, K.M. and L.S. Chitty. *Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice.* Semin Fetal Neonatal Med, 13(2): 69-75, **2008**
 - 33 . MacKenzie, I.Z., P. Bowell, H. Gregory, G. Pratt, C. Guest, and C.C. Entwistle. *Routine antenatal Rhesus D immunoglobulin prophylaxis: the results of a prospective 10 year study.* Br J Obstet Gynaecol, 106(5): 492-7, **1999**.
 - 34 . Queenan, J.T. *Noninvasive fetal Rh genotyping: the time has come.* Obstet Gynecol, 106(4): 682-3, **2005**.
 - 35 . Avent, N.D. *RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges.* Methods Mol Biol, 444: 185-201, **2008**.
 - 36 . Avent, N.D. *Large-scale blood group genotyping: clinical implications.* Br J Haematol, 144(1): 3-13, **2009**.
 - 37 . Lam, N.Y., T.H. Rainer, R.W. Chiu, and Y.M. Lo. *EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis.* Clin Chem, 50(1): 256-7, **2004**.
 - 38 . Kolialexi, A., G. Tounta, and A. Mavrou. *Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood.* Expert Rev Mol Diagn, 10(3): 285-96, **2010**.
 - 39 . Wright, C.F. and H. Burton. *The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis.* Hum Reprod Update, 15(1): 139-51, **2009**.